

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой биологической химии (биохимии) им. Р.И. Лифшица федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, доцента Сеницкого Антона Ивановича на диссертационную работу Фоминой Марии Алексеевны «Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса», представленную к защите в диссертационный совет Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Актуальность темы исследования

Изучение механизмов развития, проявлений, патогенетической роли и возможностей коррекции окислительного стресса на протяжении последних десятилетий привлекает внимание как отечественных, так и зарубежных исследователей. Значительный прогресс в этой области был достигнут описанием процесса окислительной модификации белков, продукты которого в настоящее время рассматриваются и как маркеры окислительного стресса, и как агенты развития целого ряда патологических состояний. Детальная характеристика окислительного повреждения белков тканей и субклеточных структур при различных патологических и физиологических состояниях сама по себе представляет на данный момент научный интерес, что выражается неуклонным ростом количества клинических и экспериментальных исследований, посвященных данной проблематике. При этом особую значимость приобретают исследования, направленные на поиск механизмов защиты от накопления токсичных для клетки окислительно модифицированных белков, важнейшим из которых является протеолитическая деградация. В этом аспекте весьма перспективным объектом исследований представляются цистеиновые катепсины, отличительной особенностью которых является способность к внелизосомальному действию. В последние годы наблюдается рост интереса к этой группе ферментов, вызванный обнаружением их участия в апоптозе, кроме того, формируется принципиально новое научное направление, связанное с изучением важнейшего условия проявления внелизосомальных эффектов катепсинов – пермеабиллизации лизосомальных мембран. Важно отметить, что окислительный стресс указывается отдельными исследователями в качестве одного из индукторов как апоптоза, так и пермеабиллизации лизосомальной мембраны, однако систематизированных

исследований связи окислительного стресса и лизосомального протеолиза на данный момент не имеется.

В связи с вышеизложенным, актуальность изучения состояния и механизмов изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе с установлением роли данных процессов в адаптации к окислительному повреждению белков, избранного в качестве цели диссертации Фоминой М.А., сомнений не вызывает.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Представленное диссертационное исследование отличается высокой степенью научной новизны, что обусловлено, в частности, примененным автором систематизированным подходом, позволившим впервые охарактеризовать взаимосвязь функций и распределения цистеиновых катепсинов с выраженностью окислительного стресса на уровне организма, клетки и субклеточных структур. Необходимо отметить, что при решении поставленных в исследовании задач автором были разработаны и апробированы новые методологические подходы: способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, защищенный патентом РФ и способ количественной оценки избирательной проницаемости лизосомальной мембраны для катепсинов. Существенным преимуществом работы является применение автором не только *in vivo*-, но и *in vitro*- моделирования индукции окислительного стресса, что позволило впервые продемонстрировать наличие связи изменений активности и компарментализации цистеиновых катепсинов с выраженностью окислительной модификации белков. Кроме того, впервые обнаружено и подробно описано изменение содержания окислительно модифицированных белков различных тканей при экспериментальной блокаде синтеза оксида азота и экспериментальной гипергомоцистеинемии. Значительный интерес представляют впервые описанные автором эффекты L-аргинина, не связанные с его участием в синтезе оксида азота, особенно способность вызывать снижение содержания окислительно модифицированных белков, в том числе ассоциированные с изменениями активности и компарментализации цистеиновых катепсинов.

Крайне важным и весьма перспективным для дальнейшего изучения представляется впервые обнаруженный автором феномен снижения проницаемости лизосомальных мембран при умеренной степени окислительного стресса, продемонстрированный как *in vivo*, так и *in vitro*,

выдвинутая гипотеза о значении степени окислительного повреждения белков лизосомальных мембран в механизме их пермеабиллизации может стать основой нового научного направления.

Таким образом, автором исследования было получено значительное количество оригинальных данных, степень новизны которых подтверждает высокую научную ценность диссертационной работы Фоминой М.А.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Представленные в диссертации Фоминой М.А. научные положения, выводы и рекомендации полностью отвечают цели и задачам исследования и представляются обоснованными, что обусловлено, в том числе, высоким методологическим уровнем выполнения исследования. Для решения поставленных задач автором применен комплекс адекватных и верифицированных экспериментальных моделей, в том числе *in vitro*-исследования с использованием в качестве объектов клеток и изолированных лизосом. Важно отметить, что во всех случаях автором приводятся и обсуждаются полученные в ходе исследования показатели, подтверждающие развитие ожидаемых изменений для каждой экспериментальной модели.

Для получения результатов в исследовании использовались современные биохимические методы, в том числе спектрофлуориметрия и иммунохимические методы анализа. Достоверность полученных данных и корректность обоснования научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается обоснованным использованием методов статистического анализа при помощи современных компьютерных программ.

Основные научные положения, выводы и практические рекомендации логически следуют из полученных автором результатов исследования. Следует отметить значительный уровень апробации результатов исследования: данные, полученные в работе, были неоднократно представлены в докладах на профильных научных конференциях международного и национального уровня.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Результаты диссертационной работы Фоминой М.А. характеризуются высоким уровнем научной ценности и практической значимости. Так, с точки зрения фундаментальной науки, полученные в исследовании данные существенно расширяют представления о биологических функциях цистеиновых катепсинов, механизмах изменения проницаемости лизосомальной мембраны, а также о процессе окислительной модификации

белков как о важном проявлении окислительного стресса. При этом обнаружение протективных эффектов L-аргинина в отношении окислительной модификации белков, а также продемонстрированное нарастание содержания карбонилированных протеинов при блокаде синтеза оксида азота имеет практическое значение для медицинской науки, открывая возможности поиска новых путей антиоксидантной терапии.

Особо следует отметить разработанный, многократно апробированный и внедренный в как в научную, так и практическую деятельность способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. Данный способ позволяет дать весьма детальную характеристику процессов окислительной модификации белков, оценить выраженность этапов окислительного стресса, глубину и характер повреждения белковых молекул, дать интегральную оценку резервно-адаптационного потенциала белков.

Научная и практическая значимость исследования подчеркивается внедрением его результатов в практику работы Научно-клинического центра гематологии, онкологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областной клинический кардиологический диспансер», Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница № 11», а также использованием данных, полученных при выполнении исследования, в учебном процессе кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Содержание работы, ее завершенность и оформление

Диссертационная работа Фоминой М.А. имеет традиционную структуру, соответствующую требованиям действующих нормативных документов. Диссертация включает следующие разделы: введение, 3 главы основной части (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение), заключение, выводы и практические рекомендации; список сокращений и условных обозначений, список литературы (438 источников, в том числе 356 зарубежных). Общий

объем рукописи составляет 280 страниц. Следует отметить четкость и логичность изложения.

Введение диссертации содержит обоснование актуальности темы исследования с характеристикой степени ее разработанности, формулировку цели и задач исследования, описание научной новизны, теоретической и практической значимости работы, здесь же формулируются основные положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о внедрении результатов работы и их апробации, личном вкладе соискателя.

Глава 1 – Обзор литературы – подробно и последовательно освещает современные представления об окислительной модификации белков, как маркере окислительного стресса, роли оксида азота и его производных в свободнорадикальных процессах, а также факторах управления активностью лизосомальных цистеиновых протеиназ. Особенный интерес представляет раздел обзора литературы, освещающий прогрессивно изменяющиеся в последние годы представления о внелизосомальных эффектах цистеиновых катепсинов и изменении проницаемости лизосомальной мембраны. Следует отметить использование автором значительного количества актуальных научных источников. Существенно облегчает восприятие данных, представленных в обзоре литературы, корректное использование таблиц и рисунков, при этом часть графического материала составлена, либо модифицирована автором.

В главе 2 приводится тщательное описание объекта исследований и сформированных для решения задач исследования экспериментальных моделей, что существенно повышает ценность представленной работы. Далее столь же подробно раскрывается технология получения материала для исследования, после чего приводится описание использованных в исследовании биохимических методов. Приведенные в главе данные демонстрируют высокий уровень методологических навыков автора исследования и в полной мере дают возможность как оценить адекватность сформированных моделей и примененных методов, так и, при необходимости, воспроизвести их в исследованиях сходной проблематики. Также в главе 2 содержится описание примененных автором методов статистического анализа.

В главе 3 изложены собственные результаты и их обсуждение. Структура главы составлена в полном соответствии с порядком постановки и формулировкой задач. Содержание главы отражает последовательный научный поиск, предпринятый автором в ходе решения поставленных задач. При этом подглавы 3.1. и 3.6. посвящены описанию разработанных в ходе исследования методологических подходов и содержат как научное

обоснование новых способов, так и их непосредственное описание, и примеры применения. Подглавы 3.2.-3.5. посвящены описанию и обсуждению полученных автором на *in vivo*- и *in vitro*-моделях результатов изучения состояния окислительной модификации белков и изменения активности / компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ; каждая подглава завершается кратким резюме и логически связана с последующей. Следует отметить значительное количество и разнообразие графического и табличного материала, при этом все рисунки и таблицы содержат данные статистического анализа, позволяющие получить представление о степени статистической значимости обнаруженных изменений.

Заключение обобщает основные результаты диссертационного исследования и завершается описанием перспектив исследования и дальнейшей разработки темы, что является несомненным плюсом данной работы и демонстрирует возможности формирования на ее основе новых научных направлений. Выводы соответствуют задачам и полученным результатам, представляются весьма обоснованными и корректными. Практические рекомендации соответствуют основным положениям диссертации, отличаются ясностью формулировок и обоснованностью.

Подтверждение опубликованных результатов диссертации в научных изданиях

Материалы диссертации представлены в 38 публикациях, в число которых входят 16 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (7 – в изданиях, цитируемых в международных базах данных), 1 монография, 1 методические рекомендации и 1 патент на изобретение. Публикации полностью отражают основные положения диссертации.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание и основные положения диссертационной работы. Оформление автореферата соответствует современным требованиям.

В целом, представленная работа представляет собой завершённое научно-квалификационное исследование, заслуживающее высокой оценки. Содержание, структура и оформление диссертационной работы Фоминой

М.А. в полном объеме соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени доктора наук. В процессе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие вопросы:

1. Каковы преимущества использованного в экспериментах *in vitro* метода индукции окислительного стресса? Имеет ли метод недостатки? Чем обоснован выбор такого варианта индукции окислительного стресса?
2. Каковы возможные механизмы антиоксидантного действия NO в отношении белков печени, почки, легкого (практическая рекомендация №2)? Как можно объяснить при этом прооксидантное действие донора NO (вывод №9) в отношении белков лизосом?
3. Почему на завершающем этапе исследования в качестве источника изолированных лизосом была выбрана печень? Какие из выявленных изменений могут быть органоспецифичными? Какие универсальными?
4. Как в экспериментах *in vivo*, так и в экспериментах *in vitro* продемонстрирована способность L-аргинина ограничивать интенсивность окислительной модификации белков в условиях индукции окислительного стресса. Может ли такого рода эффект отразиться на интенсивности свободнорадикального окисления других биомолекул (липиды, нуклеотиды)?
5. Какие белки лизосом могут в наибольшей степени быть подвержены окислительной модификации при пермеабиллизации лизосомальных мембран?
6. Каковы возможные взаимосвязи между перекисным окислением липидов и окислительной модификацией белков при изменении проницаемости мембран лизосом?

Заключение

Диссертация Фоминой Марии Алексеевны «Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием, формирующим новое направление в медико-биологической науке – исследование взаимосвязи проявлений окислительного стресса и функций лизосомальных протеиназ, а также предлагающим новые подходы к оценке выраженности повреждения белков при окислительном стрессе и селективной проницаемости лизосомальной мембраны, что можно квалифицировать как научное достижение. Разработка указанной проблематики имеет большое медико-социальное значение и

вносит существенный вклад в представления о механизмах развития и способах эндо- и экзогенной коррекции окислительного стресса, представленные автором теоретические и практические положения могут послужить основой разработки новых подходов терапевтического управления свободнорадикальными патологиями и апоптозом.

По актуальности, научной новизне, методологии и объему исследований, научному содержанию, достоверности и значимости полученных результатов диссертационная работа Фоминой Марии Алексеевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой биологической химии

(биохимии) им. Р.И. Лифшица

федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования

«Южно-Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор медицинских наук (03.01.04 - Биохимия),

доцент

Синицкий Антон Иванович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 454092, Российская Федерация, Уральский Федеральный округ, Челябинская область, г. Челябинск, ул. Воровского, д.64 Телефон: +7 (351) 232-74-76; +79043073017;
E-mail: kanc@chelsma.ru; Sinitskiyai@yandex.ru.

