

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук Сеницкого Антона Ивановича

на диссертацию Араповой Анастасии Ивановны на тему «Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей в условиях изменения синтеза оксида азота», по специальности 03.01.04 – Биохимия на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Актуальность избранной темы

Процесс внутриклеточного протеолиза протекает преимущественно в лизосомах – компартментах с высоким содержанием тканевых протеиназ. Помимо основной внутриклеточной функции катепсинов – регуляции оборота тканевых белков – все больший интерес исследователей вызывают их внелизосомальные эффекты, в том числе способность разрушать внеклеточный матрикс и выступать триггерами программируемой клеточной гибели. Неотъемлемой частью общих процессов клеточной регуляции является пермеабиллизация мембраны лизосом, в результате которой происходит высвобождение катепсинов в цитозоль при сохраненной структуре мембраны.

Одним из наиболее значимых спутников процесса клеточного старения является накопление окисленных белков, способных оказывать существенное влияние на функции лизосомальных ферментов. Окислительная модификация белков представляет собой процесс их ковалентной модификации, вызванной как непосредственным воздействием свободных радикалов, так и косвенным взаимодействием с вторичными продуктами оксидативного стресса. Важным последствием данного феномена считается агрегация белков, способная привести к структурным и функциональным нарушениям. Лизосомальные протеиназы, в свою очередь, осуществляют деградацию дефектных, в том числе окислительно-модифицированных белков.

Еще более актуальной в настоящее время представляется взаимосвязь оксидативного и нитрозативного стресса. Учитывая высокую функциональную нагрузку и многочисленные взаимосвязи между системами, регулирующими продукцию активных форм кислорода и азота, изучение окислительного и нитрозативного стресса в совокупности в процессе онтогенеза, при адаптации к стрессорным воздействиям, при развитии различных патологических состояний является весьма актуальным и перспективным. По этой причине многофакторные взаимосвязи лизосомальных протеиназ, окислительного, нитрозативного и карбонильного стресса в последние десятилетия привлекают все большее внимание исследователей.

Диссертационная работа Араповой А.И. посвящена изучению влияния изменений синтеза оксида азота на состояние цистеинового протеолиза и окислительной модификации белков в мышечной ткани, поэтому ее актуальность не вызывает сомнений.

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

Автором были исследованы ткани грудной аорты, сердечной и скелетной мускулатуры передней поверхности бедра крыс, были выявлены связи между изменениями активности лизосомальных цистеиновых протеиназ под влиянием модуляторов синтеза оксида азота со степенью изменений окислительной модификации белков в мышечных тканях.

В работе использованы современные биохимические методы исследования и оборудование. Научные положения, выводы и рекомендации базируются на достаточном количестве экспериментальных исследований, использовании корректных статистических методов, программного обеспечения. В исследовании использован достаточный объем литературных источников как отечественных, так и иностранных авторов.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обширный объем и характер экспериментального материала, включенного в исследование, соответствует заявленному уровню и специальности диссертации. Достоверность результатов и обоснованность выводов также базируется на адекватности экспериментальных моделей, достаточном объеме исследований, корректной статистической обработке результатов.

С применением современных и высокоинформативных методов исследования автором впервые показано влияние модуляторов синтеза оксида азота на процессы окислительной модификации белков, активность лизосомальных цистеиновых протеиназ, состояние лизосомальных мембран.

В представленной диссертационной работе впервые продемонстрирована способность карнитина проявлять мембраностабилизирующий эффект на фоне действия ингибитора синтеза оксида азота, а также впервые изучены взаимосвязи между процессами окислительной модификации белков и активностью лизосомальных ферментов на фоне изменений генерации оксида азота.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Данные, представленные в диссертации, расширяют представления о взаимосвязи процессов протеолиза и окислительной деструкции белков в условиях изменений синтеза оксида азота. Результаты исследования и оригинальное сочетание методологических подходов, использованных автором

работы, представляют особый интерес с точки зрения дальнейшего изучения механизмов тканевой адаптации на фоне нитрозативного и окислительного стресса.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты исследования могут стать основой для разработки новых методов профилактики, лабораторных методов оценки степени тяжести и прогноза развития осложнений, патогенетически направленного лечения патологических состояний, сопровождающихся нарушениями метаболизма оксида азота, сопряженных с развитием нитрозативного и окислительного стресса.

Содержание диссертации, ее завершенность

Диссертация включает введение, обзор литературы, методы исследования, главу собственных исследований, заключение, выводы, приложение. Список литературы содержит 181 источник, из них 78 российских и 103 зарубежных. Объем работы составляет 191 страница машинописного текста, содержит 51 рисунок и 32 таблицы (18 в тексте и 14 в приложении).

Во введении автор обосновывает актуальность и своевременность проводимых исследований, цель исследования, которые дают представление об основной идее и дизайне работы. Формулировка научной новизны и положений, выносимых на защиту, не вызывает возражений.

В литературном обзоре (глава 1) систематизированы современные представления о структуре и свойствах катепсинов, приводятся сведения об их биологической роли и распределении в тканях. Описаны свойства оксида азота и его модуляторов синтеза (L-аргинин, L-NAME), а так же карнитина. Особенно важна часть литературного обзора, обобщающая данные о взаимосвязи оксидативного, нитрозативного и карбонильного стресса. Используются современные источники литературы, полностью соответствующие изучаемой проблеме.

В главе «Материалы и методы исследования» (глава 2) описаны проведенные автором серии экспериментов, использованные методы исследования и обработки данных. Все представленные методы адекватны поставленным задачам, не вызывают сомнений с точки зрения их достоверности.

Результаты собственных исследований представлены в третьей главе, и в целом характеризуются систематическим, подробным, логичным и наглядным изложением. Разделы «Оценка концентрации метаболитов оксида азота» и «Оценка состояния окислительной модификации белков в представленных экспериментальных группах» содержат анализ собственных данных с учетом

оригинального структурированного методологического подхода, максимально охватывающего все составляющие окислительного повреждения белка, включающего не только общую оценку, но и качественное и количественное определение маркеров окислительной модификации, а также степень вариации резервно - адаптационного потенциала. Раздел «Оценка состояния лизосомального цистеинового протеолиза» содержит данные об активности и распределении катепсинов, показателей проницаемости лизосомальной мембраны и степени аутопроцессинга ферментов.

Третья глава завершается характеристикой корреляционных связей, выявленных в работе, и позволяет сделать некоторые выводы о взаимосвязях между окислительной модификацией белков и активностью катепсинов.

Работа завершается заключением, выводами, за которым следует список литературы и приложение. Выводы соответствуют поставленным задачам и вытекают из цели исследования. Автореферат отражает основные положения диссертации.

Все материалы диссертации опубликованы в 15 печатных работах, в том числе в 6 статьях в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертационных работ. Публикации автора имеют научную ценность и полностью отражают содержание научно-квалификационной работы. Результаты исследования и основные положения диссертационной работы были неоднократно представлены и обсуждены на научных конференциях всероссийского и международного уровня.

В целом работа представляет собой завершенное научно - квалификационное исследование, в полной мере отвечающее всем установленным требованиям, соответствующее заявленной научной специальности. Текст логично построен, содержит достаточный объем материала.

В ходе ознакомления с диссертацией возник ряд вопросов, требующих уточнения и обсуждения:

1. Какие рекомендации были использованы в отношении экспериментальной модели №4? Не вполне ясна целесообразность сочетания аргинина и L-NAME. Почему для их совместного введения выбрана доза L-NAME 25 мг/кг?
2. Уточните, какие условия выполнялись для соблюдения температурного режима в ходе гомогенизации? В ходе центрифугирования?
3. С чем связана необходимость использования L-NAME в двух дозах?
4. Графическое представление корреляционных зависимостей на рисунках №50 и 51, не содержит условных обозначений, поэтому трудно интерпретируется. Гораздо более информативным является представление результатов

- корреляционного анализа с указанием коэффициентов. Таблицы с коэффициентами были бы более уместны в третьей главе, а не в приложении.
5. Почему Вас прежде всего интересовали корреляционные взаимосвязи между окислительной модификацией белков и активностью катепсинов, но не зависимости между катепсинами и метаболитами оксида азота? Между окислительной модификацией белков и коэффициентом аутокаталитического действия лизосомальных цистеиновых протеиназ?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Араповой Анастасии Ивановны на тему «Лизосомальный цистеиновый протеолиз мышечных тканей в условиях изменения синтеза оксида азота» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи: изучено влияние экспериментального изменения уровня синтеза оксида азота на состояние лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей, имеющей важное значение для медицины и биологии, а именно для биохимии, и соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученых степеней, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент:

доцент кафедры фармации и химии фармацевтического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Д.М.Н.

(03.01.04 – Биохимия (медицинские науки))

Синицкий А.И.

454092 г. Челябинск, ул. Воровского, д. 64

Тел.: +7(904)3073017

E-mail: Sinitskiyai@yandex.ru

