

«Утверждаю»

Заместитель директора по научной
работе Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
биологии Карельского научного
центра Российской академии наук
к.б.н. О.Н. Лебедева



Handwritten signature

«31» августа 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биологии Карельского научного центра
Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН)

о научной и практической значимости диссертационной работы
Абаленихиной Юлии Владимировны на тему: «Окислительная модификация
белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных
органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия (биологические науки)

Исследования регуляторной роли протеолитических ферментов в норме и патологии относятся к числу наиболее актуальных направлений современной биологии. Катепсины цистеинового типа, относящиеся к семейству папаиноподобных протеолитических ферментов С1, наиболее многочисленны среди лизосомальных гидролаз. Фундаментальные исследования структуры и функций лизосом на современном этапе сосредоточились в области изучения роли лизосомального аппарата в поддержании протеостаза и развитии тканевых патологий. В исследованиях последних лет были выявлены специфические функции цистеиновых катепсинов, включая формирование иммунного ответа, регуляцию апоптоза, участие в дозревании белковых молекул, поддержании воспалительных процессов и другие. Многие патологические процессы протекают на фоне оксидативного стресса, маркером которого являются, в том числе, окислительно-модифицированные белки. В этих условиях катепсины, содержащие реакционноспособные группы цистеина в активных центрах,

сами могут подвергнуться окислению и, как следствие, инактивации, результатом чего может стать срыв важных биохимических механизмов, регулируемых катепсинами. С другой стороны, для поддержания гомеостаза (в данном случае – протеостаза) модифицированные окислением белки должны быть выбракованы и утилизированы внутриклеточными протеиназами, и в этом процессе лизосомально-аутофагический путь их деградации, опосредуемый катепсинами, является одним из основных. Поскольку катепсины представляют собой важную часть гомеостатической системы и в норме строго регулируются во избежание патологического повреждения клеток и тканей, для установления катепсинозависимых механизмов развития защитных реакций и гистопатологий необходима также оценка их эндогенных регуляторов. **Актуальность темы** диссертационной работы Абаленихиной Ю.В. определяется необходимостью оценки вклада лизосомальных цистеиновых протеиназ в процесс утилизации окисленных белков, образовавшихся под влиянием активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА). Диссертация посвящена комплексной оценке уровня продуктов окислительной модификации белков и активности лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L и Н в тимусе и селезенке крыс в условиях экспериментального изменения синтеза оксида азота (N₂O) с целью анализа зависимости состояния лизосомального цистеинового протеолиза от степени окислительной модификации белков.

Для выполнения поставленной цели автор, Абаленихина Ю.В., поставила перед собой ряд научных задач, с решением которых успешно справилась. Следует отметить, что цель и задачи исследования достаточно четко и ясно сформулированы, последовательно и убедительно раскрываются в тексте диссертации. Решение поставленных задач позволило получить новые данные о биохимических механизмах защиты клеток от оксидативного стресса. В практическом плане результатом работы стала разработка запатентованного способа количественной оценки карбонилированных производных белков в тканях и жидкостях организма, необходимого для получения информации о степени оксидативного повреждения.

Новизна исследования заключается в том, что автор впервые разработал и применил метод, представляющий собой комплексную оценку содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, позволивший обнаружить увеличение общего содержания карбонилированных белков в условиях *in vivo*- и *in vitro*-ингибирования синтеза оксида азота. Впервые проведена научно-обоснованная оценка индуцированного в эксперименте изменения уровня оксида азота на аутопроцессинг катепсинов В, L и Н. Впервые проведён сравнительный

анализ между увеличением количества карбонильных производных белков и активностью катепсинов В, L и Н селезенки. Таким образом, полученные диссертантом результаты имеют как **научную, так и практическую ценность**; имеется указание на то, что результаты исследования внедрены в диагностический процесс Рязанского филиала ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва».

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне. Биологический материал представлен в достаточном объеме. В работе применены высокоинформативные методы исследования, позволяющие решить поставленные в диссертационной работе задачи. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Теоретические положения основываются на известных достижениях фундаментальных и прикладных научных дисциплин, сопряженных с предметом исследования диссертации. Выводы логично вытекают из содержания работы и соответствуют поставленным задачам. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации. Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

Структура работы традиционна и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, раздел результатов и их обсуждения, заключение, выводы, список сокращений, список использованной литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 15 таблиц и 75 рисунков (диаграммы, графики, схемы). Список литературы включает 247 источников, из них 59 на русском и 188 на иностранных языках.

Во **введении** автор обосновывает постановку цели исследования и конкретных задач для ее выполнения.

Обзор литературы написан грамотно и проанализированные в нем исследования непосредственно связаны с темой диссертации. В цитируемой автором литературе отражена как история вопроса, так и современное состояние изучаемой проблемы. Автором детально рассмотрен метаболизм оксида азота в организме и его прооксидантный эффект, приводящий к образованию окислительно-модифицированных белков; особое внимание уделено сравнению подходов к количественной оценке последних. Содержатся подробные сведения о структурно-функциональных особенностях протеолитических ферментов лизосом – катепсинов, включая их роль в становлении иммунных реакций, обсуждено защитное действие регулируемой катепсинами аутофагии и ее роль в контроле качества клеточных белков. Обзор написан достаточно критично. Для написания обзора привлечено большое количество источников (более 200) и после его

прочтения становится понятным, почему автор остановился на решении вышеуказанных конкретных задач. Автор подчеркивает, что многие вопросы остаются недостаточно изученными и требуют проведения новых исследований.

В главе «**Материалы и методы**» приводится описание используемых в данной работе модельных животных (крыс Вистар), первичных клеточных культур (тимоцитов и спленоцитов крыс) и экспериментальные воздействия. Приведены использованные методики исследований, особое внимание уделено разработанному автором способу количественной оценки карбонильных производных белков. Биохимические методы, используемые при анализе протеолитической и аутокаталитической активности протеиназ, уровня их регуляторов являются общепринятыми и не вызывают сомнений. Достоверность результатов подтверждается их статистическим анализом.

В результате хорошо спланированного исследования получено огромное количество новых экспериментальных данных, которые отражены в главе, посвященной собственным **результатам и их обсуждению**. В подглаве 3.1 Ю.В. Абаленихиной охарактеризованы изученные *in vivo* и *in vitro* модели. В подглаве 3.2, наиболее обширной по содержанию, приведены экспериментальные данные, убедительно доказывающие эффект ингибитора и субстрата NO-синтазы на уровень метаболитов оксида азота в органах крыс. В подглаве 3.3 охарактеризованы изменения протеолитической активности катепсинов в зависимости от уровня карбонилирования клеточных белков. Достоинством работы является отдельная оценка активности катепсинов как в лизосомальной (седиментируемой), а так и во внелизосомальной (неседиментируемой) фракции клеток, отражающих степень лабильности лизосомальных мембран. Возможные механизмы изменения интенсивности реакций, опосредуемых катепсинами, автор попыталась выяснить путем оценки регулирующих их факторов – степени аутокаталитической активации и содержания эндогенного ингибитора – цистатина С. Ю.В. Абаленихина экспериментально продемонстрировала активацию лизосомального протеолитического аппарата при экспериментальном ингибировании синтеза NO и вызванном им повышении уровня окисленных клеточных белков, на основании чего ею был сделан обоснованный вывод о протективном значении лизосомальных катепсинов в условиях оксидативного повреждения.

Завершает работу **заключение**, в котором приводится анализ основных результатов проведенного исследования в соответствии с поставленными целью и задачами, обращается внимание на научное и практическое значение данной работы.

Выводы, адекватные поставленной цели и задачам исследования, в полной мере отражают полученные автором результаты.

Принципиальных **замечаний** не имеется. В качестве замечаний хотелось бы обратить внимание на некоторые стилистические погрешности и недочеты в изложении материала. Также к недостаткам работы можно отнести следующее:

- непривычным (и неудобным в работе) следует признать оформление библиографического списка, в котором фамилия первого автора следует за названием публикации (такой формат использован в ряде публикаций);

- для тестирования катепсина L диссертантом использован синтетический субстрат N-CBZ-L-Phe-L-Arg-7-амидо-4-метилкумарин, не обладающий абсолютной селективностью в отношении данного фермента и расщепляемый также другими катепсинами цистеинового типа (B, J, S, K, F, при этом к катепсину B его аффинность сравнительно высока); в связи с этим, в доступной литературе можно найти ссылки (например, Bahuaud et al. // *Aquaculture*. 2010. 310:213–220) о том, что об истинной активности катепсина L можно судить по разнице активностей, измеренных с помощью данного субстрата (условно, активности CatB + CatL) и специфичного для катепсина B субстрата – N-CBZ-L-Arg-L-Arg-7-амидо-4-метилкумарина. Причиной этого методологического недочета является отсутствие специфичного коммерческого субстрата для катепсина L, а следствием – определенная переоценка активности катепсина L и его вклада в изучаемые биохимические процессы;

- диссертация до некоторой степени перегружена графическим материалом. Так, можно было бы игнорировать ряд рисунков, свидетельствующих об отсутствии достоверных различий между рассматриваемыми группами (в качестве примера – рис. 55, 56), в этих случаях вполне достаточна, на мой взгляд, текстовая ссылка на отсутствие эффекта.

Автореферат полностью отражает основные положения диссертации. Результаты работы были представлены на нескольких международных и региональных конференциях, по материалам диссертации автором опубликовано 15 работ, 4 из которых – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Все выводы базируются на экспериментальных данных и вполне обоснованны.

Результаты диссертации могут послужить основой для развития подобных исследований как в самом РязГМУ им. ак. И.П. Павлова, так и в других академических институтах, а также могут быть использованы при подготовке лекционных курсов для студентов биологических специальностей вузов.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Абаленихиной Ю.В. на тему «Окислительная модификация белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота», является научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной задачи установления взаимосвязи уровня NO-зависимого оксидативного стресса и эффективности компенсаторных реакций, опосредуемых лизосомальными протеиназами – катепсинами – в органах модельных животных, имеющей существенное значение для фундаментальной биологии. Представленная диссертационная работа полностью отвечает требованиям п.9 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертационным работам, а ее автор Ю.В. Абаленихина заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв утвержден на заседании Ученого Совета ИБ КарНЦ РАН (протокол № 7 от «20» августа 2015 г.).

Главный научный сотрудник
лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН
Директор, д.б.н.,
чл.-корр. РАН, профессор

 Н.Н. Немова

31 августа 2015 г.

Почтовый адрес: 185910 г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11
E-mail: nemova@krc.karelia.ru; Тел. (8142)783615

Ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической биохимии
ИБ КарНЦ РАН к.б.н.

 Л.А. Лысенко

31 августа 2015 г.

Почтовый адрес: 185030 г. Петрозаводск, пр. Невского, д. 50
E-mail: l-lysenko@yandex.ru; тел.: (8142)571879

«Подписи д.б.н., чл.-корр. РАН, профессора Н.Н. Немовой
и к.б.н. Л.А. Лысенко ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь ИБ КарНЦ РАН, к.б.н.  Е.М. Матвеева

