

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Шумаева Константина Борисовича на диссертацию Абаленихиной Юлии Владимировны «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»

Актуальность исследования

Модификация белковых молекул активными формами кислорода и азота является патобиохимическим процессом, определяющим развитие многих заболеваний и в то же время может быть важным маркером этих патологий. Наиболее широко для оценки окислительной модификации белков используется метод определения карбонильных производных аминокислотных остатков. В последние годы активно изучается деструкция и модификация биополимеров под действием оксида азота (NO) и его метаболитов. Однако, характер влияния NO, в том числе ингибирование его синтеза, на формирование карбонильных производных белков исследовано явно недостаточно. Не ясно также как влияет продукция NO на протеолиз модифицированных протеинов. Проведение именно таких исследований в иммунокомпетентных органах крыс является целью рецензируемой работы, что и определяет её несомненную актуальность.

Научная новизна и практическая ценность

В рецензированной диссертации впервые предложен комплексный подход оценки карбонильных продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, что позволило выявить рост уровня карбонильных производных протеинов при ингибировании синтеза NO.

Также, впервые установлено, что под действием ингибитора синтеза NO (L-NAME) происходит повышение активности лизосомальных цистеиновых протеаз в тимусе и селезенке, причём активность катепсинов L и H положительно коррелирует с уровнем карбонильных производных белков.

Полученные в работе фундаментальные результаты нашли практическое отражение в патенте «Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях». Кроме того, данные диссертационного исследования могут быть использованы при преподавании биохимии в ВУЗах, а также для коррекции патологических состояний, которые связаны с окислительным стрессом.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения собственных экспериментальных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 247 источников, из них 59 российских и 188 зарубежных. Работа иллюстрирована 75 рисунками и 15 таблицами, а её объём составляет 142 страницы машинописного текста.

Во «Введении» обоснована актуальность темы исследования, определены цель и основные задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, представлены положения, выносимые на защиту, апробация результатов, личный вклад автора, публикации по результатам диссертации.

В разделе «Обзор литературы» изложены литературные данные о метаболизме NO и механизмах модификации белковых молекул в условиях окислительного стресса, в том числе процессах, приводящих к образованию карбонильных производных. Кроме того, обсуждается структура и функция лизосомальных цистеиновых протеаз (катепсинов), а также их регуляция и роль в системе иммунитета. Следует отметить, что материал раздела весьма полно отражает современные представления по рассматриваемой проблеме и свидетельствует об актуальности темы и эрудиции автора.

В следующем разделе подробно описаны материалы и экспериментальные подходы, примененные для решения поставленных задач. Диссертантом был использован широкий спектр современных аналитических и биохимических методик, адекватных цели и задачам исследования. Эти методы, включают экспериментальные модели *in vivo* и *in vitro*, определение активности ферментов,

концентрации метаболитов NO и карбонильных производных белков, статистическую обработку данных.

В третьей главе диссертации изложены и обсуждены результаты собственных исследований Абаленихиной Ю.В. Установлено, что при внутрибрюшинном введении L-NAME крысам происходит статистически значимое повышение уровня продуктов окислительной модификации белков селезенки. Этот факт подтверждается экспериментами *in vitro* (на спленоцитах). Следует отметить, что в тимусе этот эффект проявляется в виде тенденции. Автор делает достаточно обоснованное предположение о том, что в разных модельных системах дефицит синтеза NO вызывает развитие окислительного стресса в иммунокомпетентных органах крыс. Это предположение согласуется с антиоксидантным действием субстрата NO-синтаз – L-аргинина в тимусе. Показано, что при экспериментальном дефиците синтеза оксида азота аргинин корригирует окислительную модификацию белков. В то же время активность катепсинов в условиях ингибирования синтеза NO растет, причём эффект L-NAME сохраняется и в присутствии аргинина. К важным результатам полученным соискателем следует отнести также то, что изменение продукции NO влияет на аутопроцессинг катепсинов B, L, H.

Полученные результаты изложены четким и ясным языком. Представленный экспериментальный материал хорошо иллюстрирован соответствующими рисунками и таблицами, что облегчает его восприятие. В представленной диссертационной работе достигнута поставленная цель и получены приоритетные данные, касающиеся механизмов влияния NO на модификацию белковых молекул и лизосомальный цистеиновый протеолиз при окислительном стрессе в иммунокомпетентных органах крыс. Диссертация представляет несомненный интерес как с фундаментальной, так и практической точки зрения. Особо следует подчеркнуть квалифицированную организацию экспериментальной работы и хорошую профессиональную подготовку соискателя. Диссертация грамотно изложена и оформлена. Выводы, сформулированные в диссертации, соответствуют поставленным задачам. Содержание автореферата и опубликованные работы отражают основные положения и выводы диссертации.

Большой объем фактического экспериментального материала, тщательный анализ полученных данных и высокий научно-методический уровень диссертационного исследования позволяют констатировать достоверность его результатов и обоснованность сделанных на их основе выводов.

Замечания по диссертационной работе

В целом диссертационная работа производит положительное впечатление и не вызывает замечаний принципиального характера.

Вместе с тем, при общем благоприятном впечатлении от диссертационной работы Абаленихиной Ю.В., возникло несколько незначительных замечаний и вопросов:

1. Для исследования влияния избытка оксида азота на окислительную модификацию белков было бы желательно поставить эксперименты с использованием доноров NO (динитрозильных комплексов железа, S-нитрозотиолов, NONOатов).
2. Работа выиграла бы если метод Грисса дополнить методом прямого определения NO, например, ЭПР-спектроскопией с использованием спиновых ловушек оксида азота.
3. Имеет ли в настоящее время практическое применение разработанный Вами «Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях»?

Сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы и скорее носят характер пожеланий.

Заключение

Диссертационная работа Абаленихиной Юлии Владимировны «Окислительная модификация белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи, имеющей важное теоретическое и практическое значение для фундаментальной и прикладной биохимии.

