

## ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора Камилова Феликса Хусаиновича 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

Диссертационная работа Фоминой М.А. посвящена актуальной научной проблеме: установлению связи функциональной активности лизосомальных цистеиновых протеиназ со степенью окислительного повреждения белков и выявлению возможной роли цистеиновых катепсинов в адаптации клеток и тканей к окислительному стрессу.

Окислительная модификация белков является относительно недавно описанным процессом, продукты которого в настоящее время рассматриваются как в качестве удобных для определения и весьма информативных маркеров окислительного стресса, так и в качестве потенциальных участников патогенеза свободнорадикальных патологий. При этом возможная утрата биологических функций белков в процессе их окислительной модификации, а также потенциальное токсическое действие продуктов этого процесса диктуют необходимость изучения возможностей организма препятствовать образованию/накоплению подобных веществ. В этой связи особенную значимость приобретают комплексные исследования, изучающие участие различных протеолитических систем в адаптации тканей к окислительному стрессу. Избранная автором система лизосомальных цистеиновых протеиназ, способных покидать пределы своих компартментов и проявлять как экстра-, так и интрацеллюлярные эффекты, является на данный момент объектом многочисленных исследований, связанных с участием этих ферментов в целом ряде патологических и адаптивных реакций. В том числе, существуют немногочисленные указания как на возможность участия цистеиновых катепсинов в деградации окислительной модифицированных белков, так и на потенциальную роль окислительного стресса в изменении проницаемости лизосомальной мембраны, однако эти

сведения весьма разрозненны и не позволяют сформировать законченную картину процесса. Таким образом, актуальность темы диссертационного исследования Фоминой М.А. сомнений не вызывает.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Следует отметить значительную степень научной новизны диссертационного исследования Фоминой М.А., в котором был получен и представлен существенный спектр оригинальных научных результатов.

В частности, автором впервые было обнаружено нарастание содержания продуктов окислительной модификации белков различных клеток и тканей на фоне экспериментального подавления синтеза оксида азота и впервые выявлена обратная зависимость содержания продуктов карбонилирования протеинов от концентрации метаболитов оксида азота. Также в диссертационной работе впервые обнаружены и подробно описаны изменения содержания продуктов окислительной модификации белков цитоплазмы печени, почки, легкого и миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии. Очень интересными являются полученные автором новые сведения о роли L-аргинина, чаще используемого в эксперименте и клинике в качестве субстрата синтеза оксида азота, а именно его способность приводить к снижению содержания продуктов окислительной модификации белка как при изолированном применении, так и на фоне индукторов окислительного стресса.

Кроме того, впервые в *in vivo*- и *in vitro*- экспериментах описаны зависимости изменений активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ, а также показателей проницаемости лизосомальной мембраны от уровня продуктов окислительной модификации белков. Весьма оригинальным является также впервые проведенное автором исследование изменений активности цистеиновых катепсинов, проницаемости лизосомальной мембраны и содержания карбонилированных протеинов при прямом *in vitro*- воздействии индукторов окислительного стресса на изолированные лизосомы печени крыс.

Помимо вышеизложенного, научная новизна исследования определяется также фактом разработки в ходе его выполнения авторских способов комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях и оценки избирательной проницаемости лизосомальной мембраны для цистеиновых катепсинов.

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

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе Фоминой М.А. характеризуются высокой степенью обоснованности и достоверности. Это обусловлено, в частности, квалифицированным подходом к планированию и выполнению исследования, применением адекватных цели и задачам методологических подходов, использованием верифицированных экспериментальных моделей и современных методов статистического анализа. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации Фоминой М.А. базируются на значительном объеме полученных автором экспериментальных данных в сочетании с глубоким анализом современной научной литературы. Дополнительным подтверждением обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы является их апробация путем публикаций в рецензируемых научных изданиях и представления к обсуждению на многочисленных научных конференциях по профилю специальности.

## **Научная и практическая значимость полученных результатов**

Диссертационное исследование Фоминой М.А. носит преимущественно фундаментальный характер, при этом его результаты отличаются существенной научной и практической значимостью, внося вклад в систему знаний о роли и механизмах регуляции активности цистеиновых катепсинов, о факторах, влияющих на проницаемость лизосомальных мембран, а также о механизмах и этапах повреждения белков при окислительном стрессе. Выявление автором изменений проницаемости лизосомальной мембраны на фоне модификации белков при окислительном стрессе не только существенно дополняет представления о механизмах пермеабилзации лизосомальной мембраны, но и может стать основой для смежных исследований, касающихся разработки способов регуляции апоптоза, что на данный момент востребовано в иммунологии и онкологии. Полученные автором новые данные об протективных и корректирующих эффектах L-аргинина при окислительном стрессе также имеют значение не только для биологии, но и для медицины, открывая возможности поиска и обоснования новых подходов для профилактики и компенсации тканевых изменений при патологиях, в развитии которых доказана роль окислительного стресса.

Научная и практическая значимость исследования подтверждена 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» и их использованием 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 изложена на 280 страницах машинописного текста, структура включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы и практические рекомендации. Список литературы содержит 438 источников: 82 отечественных и 356 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 88 рисунками и 34 таблицами.

Введение содержит все необходимые в данном разделе элементы, значительное внимание автор уделяет подробному обоснованию актуальности темы с указанием степени ее разработанности. Сформулированная цель исследования четко сформулирована и логически связана с актуальностью, задачи полностью соответствуют цели и призваны способствовать ее достижению. Также автор описывает научную новизну исследования, его теоретическую и практическую значимость, формулирует основные положения, выносимые на защиту, приводит данные о методологии исследования, апробации результатов и их внедрении в практику и учебный процесс.

В обзоре литературы автор приводит подробный и глубокий анализ современных научных источников, последовательно описывая состояние вопроса по избранной проблематике. Хотелось бы отметить значительное количество проанализированных современных литературных источников и рациональное использование иллюстративного материала: приведенные в главе таблицы и схемы очень наглядны, часть составлена лично автором, в

остальных случаях имеется корректное указание на источник цитирования или модификации. В целом глава написана очень интересно и демонстрирует способность автора к анализу научных источников и синтезу их данных для формирования представлений об уровне разработки научной проблемы.

Глава "Материалы и методы исследования" написана весьма подробно и содержит полное описание объекта исследования, экспериментальных моделей, методов получения и анализа материала, статистической обработки. Обращает на себя внимание значительное разнообразие материалов исследования: в полном соответствии с поставленными задачами автором используются фракционированные лейкоциты периферической крови, клетки тимуса и селезенки, цитоплазматическая и лизосомальная фракции гомогенатов тканей и суспензии лизосом; при этом для каждого случая приводится описание протокола получения материала. В диссертационной работе используются преимущественно биохимические методы исследования, для каждого из которых приводится принцип метода, процедура регистрации и используемое оборудование, единицы измерения.

Глава "Результаты исследования и их обсуждение" занимает существенную часть общего объема работы, при этом материал тщательно структурирован, содержание разделов полностью соответствует их названиям, изложение отличается внутренней логикой и связностью. Последовательность разделов главы полностью соответствует последовательности формулировки задач исследования. Из 6 разделов главы 2 посвящены обоснованию и примерам применения разработанных в ходе работы методологий: раздел 3.1. описывает разработку способа комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, а раздел 3.6 – возможности оценки селективного изменения компартиментализации активности цистеиновых протеиназ. Остальные 4 раздела содержат непосредственно результаты, полученные автором в *in vitro*- и *in vivo*- экспериментах; по мере представления результатов автор проводит их обсуждение в свете современных научных представлений. Восприятие значительного количества описываемых в работе экспериментальных данных существенно облегчается их грамотным распределением в рисунках и таблицах, в частности, очень удачным решением является представление каждого типа результатов в рисунках или таблицах определенного формата. Весь графический материал содержит числовые указания степени статистической значимости отличий. Кроме того, разделы главы логически переходят друг в друга, создавая в итоге завершённую картину научного поиска в рамках избранной темы.

Заключение содержит изложение основных итогов выполненного исследования и описание перспектив исследования и дальнейшей разработки темы.

Выводы полностью соответствуют задачам, основываются на результатах исследования, корректно сформулированы. Практические рекомендации отличаются конкретикой и содержательностью.

#### **Подтверждение опубликования результатов диссертации в научных изданиях**

По теме диссертации автором опубликовано 38 научных работ, среди которых 16 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 1 патент на изобретение, 1 монография, 1 методические рекомендации. Материалы, представленные в научных публикациях, полностью отражают основные результаты и положения диссертационной работы.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

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

В целом, диссертационная работа Фоминой М.А. оставляет самое положительное впечатление и позволяет говорить о научной зрелости и высокой квалификации ее автора.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. В ходе анализа работы возникли следующие вопросы уточняющего и дискуссионного характера:

1. В тканях животных выявлено более 10 цистеиновых лизосомальных протеиназ. Чем обусловлен выбор катепсинов В, Н, L для изучения роли цистеиновых протеолитических ферментов в окислительном стрессе?
2. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* с использованием модуляторов синтеза оксида азота и при экспериментальной гомоцистеинемии Вами установлены тканевые различия направленности изменений активности изучаемых катепсинов, их аутокатализа, коэффициента лабилизации. Эти различия связаны с особенностями выраженности окислительной модификации белка в отдельных тканях?

3. Каков, по Вашему мнению, основной механизм протективного действия L-аргинина на активность цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе?

### Заключение

Таким образом, диссертационная работа Фоминой Марии Алексеевны «Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой на высоком методологическом уровне доказана взаимосвязь проявлений окислительного стресса с функциональной активностью лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемостью лизосомальной мембраны. На основании проведенных исследований автором разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области биохимии.

По своей актуальности, научной новизне, объему исследований и достоверности их результатов, теоретической и практической значимости диссертационная работа Фоминой Марии Алексеевны «Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса» полностью 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:

профессор кафедры биологической химии  
федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Башкирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук (03.01.04 - Биохимия),  
профессор

 Камиллов Феликс Хусаинович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 450000, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3  
Телефон: +7 (347) 272-41-73; E-mail: rectorat@bashgmu.ru

*29.11.2018*

