

ОТЗЫВ

**официального оппонента, главного научного сотрудника, руководителя
отдела биохимии свободнорадикальных процессов Федерального
государственного бюджетного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, доктора биологических наук,
профессора, Ланкина Вадима Зиновьевича 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 диссертационной работы

Диссертация М.А.Фоминой посвящена исследованию взаимосвязи между изменениями проницаемости лизосомальных мембран, а также активности цистеиновых катепсинов и выраженностью окислительного стресса, критерием которого являлся уровень окислительно модифицированных белков. Основное внимание в работ М.А.Фоминой привлечено к исследованию изменений функционального состояния и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе. Это направление исследований следует признать достаточно важным, поскольку до сих пор работы такого рода фактически отсутствовали. Важность такого рода исследований определяется выявленным в последние годы участием свободнорадикальных процессов в механизмах апоптоза, в котором не последняя роль принадлежит цистеиновым катепсинам. Актуальным является также выяснение роли оксида азота в этих процессах, который, в зависимости от различных условий, способен проявлять как прооксидантное, так и антиоксидантное действие *in vivo*. Исходя из вышесказанного, тема диссертационной работы

М.А.Фоминой представляется вполне своевременной и достаточно актуальной.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Фоминой М.А. впервые обнаружила увеличение содержания карбонилированных белков при подавлении синтеза оксида азота в опытах *in vitro* и *in vivo*. Автором получены данные о карбонилировании белков в паренхиматозных органах и, в значительно большей степени, в миокарде при экспериментальной гипергомоцистеинемии. М.А.Фомина получила новые данные об изменении активности и распределении цистеиновых катепсинов при окислительном стрессе, причем в работе впервые обнаружена взаимосвязь изменения активности этих ферментов при увеличении содержания карбонилированных белков в экспериментах *in vivo*, причем *in vitro* исследовано влияние окислительного стресса на активность цистеиновых катепсинов и проницаемость мембран изолированных лизосом. Автором обнаружено, что введение L-аргинина способно уменьшать выраженность гипергомоцистеинемии и степень карбонилирования белков. М.А.Фоминой получены также данные о способности L-аргинина снижать содержание окислительно модифицированных белков в цитоплазматической и лизосомальной фракции ткани печени. Следует отметить, что автором диссертации разработан модифицированный метод количественного определения содержания карбонилированных протеинов.

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

Для достижения цели исследования и решения поставленных задач автором применен широкий спектр биохимических методов исследования. Активность цистеиновых катепсинов исследовали спектрофлуориметрически по гидролизу специфических флуорогенных субстратов, для характеристики выраженности окислительного стресса в качестве маркера использовали определение степени карбонилирования белков. Для исследования ферментов в интра- и экстрализосомальной фракции, а также проницаемости лизосомальных мембран использовали метод дифференциального центрифугирования. Результаты исследований статистически обработаны и сомнений не вызывают. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на 16 научных конференциях.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Полученные автором данные способствуют углублению представлений о роли оксида азота в развитии свободнорадикальных процессов. Важными являются результаты об изменении проницаемости лизосомальной мембраны при окислительном стрессе. Полученные в диссертационной работе результаты и сформулированные теоретические положения вносят существенный вклад в понимание механизмов окислительного стресса. Результаты диссертации имеют определенное практическое значение, в частности, выявленное в диссертационной работе позитивное действие L-аргинина по ограничению окислительной модификации белков может быть использовано для разработки новых подходов к коррекции окислительного стресса.

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность 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 использованием результатов 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

Диссертация написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации. Объем диссертации составляет 280 страниц, библиографический указатель включает 438 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность темы и степень ее разработанности, после чего логично формулирует цели и задачи исследования. В главе 1 представлен обзор литературы, где автор на

основании современных научных источников представляет анализ представлений об окислительной модификации белков, о роли оксида азота в свободнорадикальных процессах, о механизмах регуляции активности лизосомальных цистеиновых протеиназ, а также о внелизосомальных эффектах цистеиновых катепсинов и их влиянии на проницаемость лизосомальной мембраны. Глава 2 представляет подробное описание материалов и методов исследования. Особое внимание уделено тщательному описанию процедуры количественного анализа карбонильных производных белков и активности цистеиновых катепсинов. В главе 3 излагаются результаты, полученные автором исследования, а также их обсуждение с учетом результатов предшествующих исследований. Заключение суммирует основные результаты диссертации и предлагает их трактовку. Выводы соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Подтверждение опубликования результатов диссертации в научных изданиях

Результаты диссертационного исследования отражены в 38 публикациях, в том числе в 16 статьях в научных изданиях, рекомендованных ВАК (из них – 7 в изданиях, цитируемых в системах Scopus и Web of Science); имеется монография, патент на изобретение и методические рекомендации.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат достаточно полно отражает основное содержание опубликованных по теме диссертации научных статей.

Замечания по диссертационной работе:

1. Несмотря на то, что в диссертации список сокращений имеется (к сожалению, он помещен не в конце или начале диссертации, а на 235 странице, до списка литературы, что затрудняет его поиск), в автореферате список сокращений отсутствует;
2. Подписи к рисункам и таблицам не всегда содержат необходимые сведения. Например, подпись к табл.1 в автореферате (табл.6 в диссертации) не содержит подробных данных о способе

моделирования окислительного стресса (время экспозиции). Парадоксальные результаты экспериментов, приведенные в этих таблицах, с моей точки зрения, не получили исчерпывающих объяснений. Действительно, не понятно, почему активность катепсинов полиморфноядерных лейкоцитов ингибируется в процессе инкубации в среде с весьма высокой (5 мМ) концентрацией пероксида водорода (автор постоянно пишет «перекись водорода», вопреки написанию по принятой номенклатуре), тогда как активность катепсинов моноядерных лейкоцитов в тех же условиях, напротив, весьма существенно возрастает;

3. Не вполне понятно, почему в опытах, результаты которых приведены в табл.3 автореферата, инкубация лизосом печени с 5мМ пероксида водорода сопровождается парадоксальным увеличением активности катепсинов В и L, тогда как карбонилирование белков лизосом возрастает (что вполне логично);
4. В диссертации имеются отдельные неудачные выражения, затрудняющие восприятие текста; к сожалению, в выводах цифровые значения не приводятся, автор ограничивается обозначением направленности изменений.

Сделанные замечания и возникшие вопросы не влияют на корректность выводов и достоверность полученных результатов, поскольку, в основном, относятся к некоторым погрешностям в оформлении работы.

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, представляет собой законченное, самостоятельное научно-квалификационное исследование, предлагающее новый подход к исследованию проблемы окислительного стресса с оценкой состояния лизосомальных протеиназ в ходе окислительного повреждения белков. По актуальности, объему исследований, примененным методологическим подходам, научной новизне, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа Фоминой Марии Алексеевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых

степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), а автор заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник, руководитель отдела биохимии свободнорадикальных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор биологических наук (03.01.02 – Биофизика) профессор (03.01.04 – Биохимия)

В.З. Ланкин

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 121552, г. Москва, 3-я Черепковская 15А; Телефон: +7(495)150-44-19; e-mail: info@cardioweb.ru

Подпись д.б.н. Ланкина В.З. заверяю:

Ученый секретарь
ФГБУ «НМИИ кардиологии» Минздрава РФ,
доктор медицинских наук

А.А.Скворцов

6 декабря 2018 г.

