

УТВЕРЖДАЮ

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный
медицинский университет имени
академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук,
профессор _____ Р.Д. Калинин
« 14 » _____ 2018 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация Фоминой Марии Алексеевны «Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса» выполнена на кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В период подготовки диссертации соискатель Фомина Мария Алексеевна работала в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО в должности доцента.

В 1993 году с отличием окончила Рязанский государственный медицинский институт имени академика И.П. Павлова по специальности «Лечебное дело».

В 1996 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ у больных хроническими лейкозами в динамике заболевания» по специальности «Биохимия».

Научный консультант:

Терентьев Александр Александрович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, федеральное государственное

бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.Н. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета, профессор кафедры

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Прогрессивное развитие системы знаний об окислительном стрессе, представляющем собой дисбаланс про- и антиоксидантных реакций, к настоящему моменту сформировало представления о его вовлеченности в патогенез обширного круга заболеваний, а также в целый ряд адаптивных процессов, что стимулирует дальнейшие исследования по поиску новых агентов, маркеров и мишеней свободнорадикальных процессов, способных внести вклад в понимание механизмов развития окислительного стресса и способов его коррекции. Существенный прогресс в этой области был достигнут исследованиями, продемонстрировавшими вклад в свободнорадикальные процессы активных форм азота, сочетавшимися с описанием антиоксидантных эффектов оксида азота. Кроме того, в настоящее время активно развивается направление исследований, связанное с обнаружением и описанием процесса окислительной модификации белков, продукты которого рассматриваются современными исследователями не только в качестве наиболее стабильных и удобных для количественного определения показателей выраженности окислительного стресса, но и как участники физиологических и патологических реакций.

На данный момент известно, что в качестве индукторов окислительной модификации белков способны выступать как активные формы кислорода и азота, так и продукты перекисного окисления липидов, а также металлы переменной валентности и редуцирующие сахара, появляются работы, демонстрирующие значение для этого процесса нарушений соотношения про- и антиоксидантных эффектов в условиях истощения антиоксидантной системы. Также последние годы ознаменованы появлением значительного количества не только экспериментальных, но и клинических исследований, использующих уровень окислительной модификации белков в качестве маркера окислительного стресса. Тем не менее, исследования в области описания выраженности и характера окислительной модификации белков при адаптивных и патологических процессах, ассоциированных с окислительным стрессом, а также изучения возможностей, способов и механизмов защиты от токсического действия продуктов окислительного повреждения протеинов сохраняют высокую степень актуальности.

В частности, перспективным представляется выяснение антиоксидантных возможностей оксида азота в отношении процесса окислительной модификации белков, поскольку эта часть эффектов, в

отличие от прооксидантных, на данный момент практически не изучена, при том, что наличие других антиоксидантных эффектов этого соединения в настоящее время создало значимое для медицины направление по созданию лекарственных препаратов, способных стабилизировать и транспортировать оксида азота.

Важнейшим механизмом защиты от накопления и токсического действия продуктов окислительной модификации белков признана их протеолитическая деградация. Наиболее изученным механизмом утилизации окисленных протеинов на данный момент является протеасомный протеолиз, однако в последние годы появляются сведения об участии в деградации окислительно поврежденных белков отдельных митохондриальных протеаз, а также лизосомальных катепсинов, также обсуждается возможность участия в этом процессе шаперон-опосредованной аутофагии.

Среди известных на данный момент более чем 50 лизосомальных гидролаз особое внимание исследователей привлекает группа лизосомальных цистеиновых протеиназ (ЛЦП, цистеиновые катепсины), особенностью которых является способность к деградации не только внутриклеточных, но и экстрацеллюлярных белков.

Особенности структуры цистеиновых катепсинов, создающие способность к внелизосомальному действию и чувствительность к многочисленным факторам управления активностью, делают их привлекательными кандидатами на роль потенциальных факторов утилизации окислительно модифицированных белков в цитоплазме клетки, что могло бы оказаться существенным дополнением к работе эндосомально-лизосомальной и протеасомной систем деградации поврежденных белков.

В течение многих лет исследования ЛЦП акцентировались в области их экстрацеллюлярных эффектов, что к настоящему времени позволило сформировать представления не только о вовлеченности данной группы ферментов в патогенез целого ряда распространенных и медико-социально значимых заболеваний, но и о возможностях фармакологического управления их действием.

При сохранении интереса к экстрацеллюлярным эффектам цистеиновых катепсинов, последние годы ознаменовались новым витком исследований, связанных с обнаружением участия лизосомальных протеиназ, в большей степени ЛЦП, в механизмах апоптоза, причем не только по классическому, каспазо-зависимому, но и по отдельному, лизосомально-опосредованному пути. Это, фактически, привело к формированию нового научного направления, разработка которого не только требует дальнейшего уточнения механизмов интра- и внелизосомальной регуляции активности цистеиновых катепсинов, но и создает необходимость подробного изучения факторов, способных оказывать эффекты на прижизненную проницаемость (пермеабиллизацию) лизосомальных мембран, влияя тем самым на выход ферментов в цитоплазму.

Поскольку активное изучение механизмов пермеабилзации лизосомальных мембран началось относительно недавно, процесс находится в настоящее время на этапе активного накопления экспериментальных данных и полная систематизированная картина на данный момент не получена. При этом в качестве одного из факторов повышения проницаемости лизосомальной мембраны указывается окислительный стресс, однако исследования механизмов связи этих процессов весьма немногочисленны и описывают, в основном, состояние перекисного окисления липидов лизосомальных мембран. Тем не менее, имеются указания на участие цистеиновых катепсинов в АФК-индуцированном апоптозе, и возможности АФК способствовать ПЛМ через активацию Ca^{2+} -каналов, а также появляются сведения о стабилизации лизосомальной мембраны под действием антиоксидантов, хотя результаты исследований пока весьма фрагментарны.

Таким образом, исследование взаимосвязей изменений активности цистеиновых катепсинов и проницаемости лизосомальной мембраны с уровнем окислительной модификации белка при состояниях, ассоциированных с окислительным стрессом, а также поиск факторов, способных оказывать корректирующее действие на указанные процессы, представляется актуальным направлением, имеющим важное биомедицинское значение. Разработка направления способна как расширить понимание механизмов воздействия окислительного повреждения протеинов на активность ферментов и проницаемость мембран и внести вклад в представления о роли лизосомального протеолиза в протеостате, так и послужить основой для дальнейших исследований в области антиоксидантной терапии и фармакологических путей управления апоптозом.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

втором были исследованы изменения общей активности лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н на клеточном и тканевом уровне в экспериментальных моделях, ассоциированных с окислительным стрессом; изучено наличие и описан характер окислительного повреждения белков тканей при *in vivo*-воздействии неселективного ингибитора и субстрата NO-синтазы, а также при экспериментальной гипергомоцистеинемии; исследованы изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н, состояния проницаемости лизосомальной мембраны в тканях *in vivo* под действием модуляторов синтеза оксида азота и при экспериментальной гипергомоцистеинемии; исследованы изменения активности и компарментализации катепсинов В, L, Н, состояния проницаемости лизосомальной мембраны в изолированных лизосомах при *in vitro*-индуцированном окислительном стрессе; изучены эффекты L-аргинина в

коррекции показателей окислительной модификации белков, установить его роль в данном процессе в качестве фактора, изменяющего активность и компарментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ; проведен анализ связей показателей состояния окислительной модификации белков и изменений активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н.

Были разработаны теоретические положения о состоянии и механизмах изменения активности и компарментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе и выявлена роль функционального состояния цистеиновых протеиназ лизосом различных тканей в процессе адаптации к окислительному повреждению белков, разработан способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, предложен способ оценки селективного изменения компарментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ.

Непосредственное участие автора заключалось в планировании и организации исследования, постановке задач, разработке дизайна, методической поддержке и проведении экспериментов, статистической обработке и анализе полученных результатов, формулировке научных положений и выводов. Все изложенные в диссертации результаты получены автором либо в ходе самостоятельно проведенных исследований, либо при работе в рамках подготовки диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук под научным руководством автора и при его непосредственном участии. Соавторы исследований указаны в публикациях.

Объем и характер заимствованных фрагментов текста диссертации позволяют считать их законными цитатами.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне с использованием статистических методов: проверка нормальности распределения данных осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка (W-критерий). Для вариационных рядов с отсутствием согласия данных с нормальным распределением вычисляли характеристики: медиану (Me), верхний и нижний квартилей (Q1 и Q3 соответственно), результаты представляли в формате Me [Q1;Q3]; при построении графиков использовались также минимальное (min) и максимальное (max) значение. При нормальном распределении данных вычисляли среднее значение (M) и стандартное отклонение (s), результаты представляли в формате $M \pm s$. Для оценки статистической значимости различий независимых выборок при отсутствии согласия данных с нормальным распределением использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест), для нормального распределения – t-критерий Стьюдента. Оценку ранговой корреляции осуществляли с помощью коэффициента Спирмена. В работе использованы современные

преимущественно биохимические методы: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, иммунохимические, колориметрия; в качестве вспомогательных методов применялись дифференциальное центрифугирование и световая микроскопия, примененные методики адекватны цели и задачам исследования.

Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований со статистической обработкой результатов с помощью программ «Microsoft Office Excel 2013» и «Statistica 10.0».

Достоверность первичных материалов подтверждена их экспертной оценкой и не вызывает сомнений. Научные положения, полученные выводы и практические рекомендации достаточно обоснованы и логически вытекают из результатов исследования. В исследовании использован достаточный объем литературных источников как отечественных, так и иностранных авторов.

Новизна результатов проведенных исследований

В данной работе впервые на организменном, тканевом, клеточном и субклеточном уровне продемонстрирована связь изменений активности и компарментализации цистеиновых катепсинов с окислительным стрессом, оцениваемом по выраженности и характеру окислительной модификации белков.

При выполнении исследования разработан способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях, позволивший впервые осуществить полное количественное измерение содержания продуктов спонтанного и металл-катализированного карбонилирования белков с характеристикой соотношения первичных и вторичных маркеров их окислительного повреждения в моделях, сопряженных с окислительным стрессом. Получен патент на изобретение (№2524667 от 27.07.2014). Предложен новый способ количественной оценки избирательной проницаемости лизосомальной мембраны для индивидуальных представителей группы катепсинов.

Впервые показано, что подавление синтеза оксида азота универсально приводит к нарастанию содержания продуктов окислительной модификации белков в тимоцитах и спленоцитах (*in vitro*) и цитоплазматической фракции ткани печени, почки и легкого (*in vivo*); в *in vivo*- моделях впервые обнаружена обратная зависимость содержания продуктов окислительной модификации белков от концентрации метаболитов оксида азота. Впервые описаны изменения содержания продуктов окислительного карбонилирования белков в цитоплазматической фракции ткани печени, почки, легкого и миокарда экспериментальной гипергомоцистеинемии.

В *in vitro*- и *in vivo* экспериментах впервые продемонстрирована чувствительность общей активности цистеиновых катепсинов к развитию окислительного стресса, впервые обнаружена прямая зависимость общей

активности катепсинов В, L, Н от содержания продуктов окислительного карбонилирования белков.

Впервые описаны зависимости изменений активности и субклеточного распределения лизосомальных цистеиновых катепсинов В, L, Н, а также состояния проницаемости лизосомальной мембраны от выраженности окислительной модификации белков при *in vivo*-моделировании ситуаций, сопряженных с окислительным стрессом.

Впервые исследовано прямое *in vitro* воздействие индукции окислительного стресса на уровень окислительного карбонилирования белков, активность цистеиновых катепсинов и проницаемость мембраны изолированных лизосом печени крыс с оценкой корректирующего действия L-аргинина.

Обнаружен ранее неизвестный феномен снижения проницаемости лизосомальных мембран при умеренном/кратковременном окислительном стрессе, что позволило впервые сформулировать тезис о значении степени повреждения белков лизосомальных мембран в механизме пермеабиллизации.

Получены новые данные об эффектах L-аргинина, не связанных напрямую с участием в генерации оксида азота: обнаружено, что L-аргинин при изолированном применении способен приводить к уменьшению содержания продуктов окислительной модификации белков в цитоплазматической фракции и лизосомах печени крыс, снижать уровень гомоцистеина в крови при экспериментальной гипергомоцистеинемии, корректировать вызванное провокаторами окислительного стресса нарастание содержания окислительно карбонилированных белков, в том числе через влияние на активность и компарментализацию цистеиновых катепсинов.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Выявление изменений проницаемости лизосомальной мембраны на фоне окислительного повреждения белков является существенным дополнением активно развивающегося направления исследований механизмов пермеабиллизации лизосомальной мембраны и позволяет определить новые мишени для фармакологического управления ситуациями, сопряженными с апоптозом.

Описанные протективные эффекты L-аргинина дополняют представления о его биологической роли и могут быть использованы для разработки новых подходов терапевтической коррекции состояний, ассоциированных с окислительным стрессом.

Разработанный способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков применим для тканей и биологических жидкостей и его внедрение существенно повышает информативность количественной оценки содержания карбонилированных протеинов, являющихся современным маркером окислительного стресса.

Ценность научных работ соискателя

Полученные в ходе исследования результаты существенно расширяют фундаментальные представления о механизмах и этапах повреждения белков при окислительном стрессе и способах эндогенной и экзогенной коррекции развивающихся изменений, а также способствуют более глубокому пониманию роли оксида азота в развитии свободно-радикальных патологий.

Обнаруженные корреляции между активностью цистеиновых катепсинов и выраженностью окислительной модификации белков вносят значительный вклад в систему знаний об этой группе ферментов и могут стать основой для дальнейших исследований роли этих компонентов деградационного пула контроля протеостаза в защите клетки от окислительного повреждения.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена исследованию состояния и механизмов изменения активности и компартиментализации лизосомальных цистеиновых протеиназ при окислительном стрессе и выявлению роли функционального состояния цистеиновых протеиназ лизосом различных тканей в процессе адаптации к окислительному повреждению белков.

Она соответствует паспорту специальности 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 39 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 16 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России.

Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные цитатно-аналитические базы

1. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ лейкоцитов при *in vitro* моделированном оксидативном стрессе / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина // **Цитокины и воспаление.** – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 156-158.

2. Окислительная модификация белков и активность катепсина Н тимоцитов крыс в условиях *in vitro* модулирования синтеза оксида азота (II) [Текст] / Ю.В. Абаленихина, М.А. Фомина // **Казанский медицинский журнал.** – 2014. – Т. 95, № 4. – С. 553-557.

3. Окислительное карбонилирование белков стенки сосудов в динамике экспериментального венозного тромбоза [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков // **Ангиология и сосудистая хирургия.** – 2015. – № 1. – С. 29-34.

4. Влияние L-аргинина и карнитина на активность катепсинов L и H и проницаемость лизосомальной мембраны в сердечной мышце при

выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // **Казанский медицинский журнал.** – 2015. – Т. 96, №5. – С. 819-824. Влияние L-аргинина на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ в эксперименте и при стимуляции оксидативного стресса *in vitro* [Текст] / М.А. Фомина, А.М. Кудлаева // **Казанский медицинский журнал.** – 2015. – Т. 96, № 5. – С. 876-882.

5. Влияние L-N^o-нитроаргинина метилового эфира и нитропрусида натрия *in vitro* на окислительную модификацию белков лизосом печени крыс [Текст] / М.А.Фомина, А.М.Кудлаева, С.А.Исаков, А.Н. Рябков // **Казанский медицинский журнал.** – 2017. – Т. 98, № 6. – С. 1005-1011.

6. *In vitro*-эффекты нитропрусида натрия и L-N^o-нитроаргинина метилового эфира на активность лизосомальных цистеиновых протеиназ и проницаемость мембраны лизосом [Текст] / М.А.Фомина, А.М.Кудлаева, С.А.Исаков, В.В.Давыдов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2018. – № 1. – С. 43-46.

Работы, опубликованные в других рецензируемых научных изданиях перечня ВАК при Минобрнауки России

7. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ плазмы и лейкоцитов крови в динамике экспериментального тромбоза у крыс / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, Р.Е. Калинин, А.А. Герасимов, А.Н. Новиков // **Фундаментальные исследования.** – 2013. – № 2-1. – С. 197-200.

8. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеиназ стенки сосудов в динамике экспериментального тромбоза у крыс [Текст] / Н.В. Фомина, М.А. Фомина, Р.Е. Калинин, А.А. Герасимов, А.Н. Новиков // **Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова.** – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 73-76.

9. Оценка активности катепсинов L, H и степени их секреции в сердечной мышце при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // **Фундаментальные исследования.** – 2014. – № 10-9. – С. 1725-1728.

10. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс [Текст] / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.** – 2014. – № 4. – С. 42-46.

11. Состояние окислительного карбонилирования белков мышечных тканей при выраженной гипергомоцистеинемии [Текст] / А.С. Ильичева, М.А. Фомина // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.** – 2015. – № 1. – С. 45-51.

12. Влияние L-аргинина и L-карнитина на окислительную модификацию лизосомальных белков печени крыс [Текст] / А.М. Кудлаева, М.А. Фомина, С.А. Исаков // **Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науке о Земле.** – 2017. – Т. 27, № 3. – С. 368-374.

13. Влияние аргинина на активность и компартиментализацию лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов при оксидативном стрессе на фоне экспериментальной гипергомоцистеинемии [Текст] /М.А. Фомина, А.А. Терентьев // **Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.**– 2018.– № 2.– С. 195-212.

14. Способ оценки селективного изменения компартиментализации активности лизосомальных цистеиновых протеиназ [Текст] /М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина, А.М. Кудлаева, А.А. Терентьев // **Наука молодых (Eruditio Juvenium).**– 2018.– Т.6, № 2.– С. 277-284.

16. Изменения субклеточного распределения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов крыс под действием модуляторов синтеза оксида азота [Текст] /М.А. Фомина, А.А. Терентьев // **Исследования и практика в медицине.**– 2018.– № 3.– С. 28-39.

Диссертация Фоминой Марии Алексеевны «Лизосомальные цистеиновые протеиназы в условиях окислительного стресса» рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки).

Заключение принято на межкафедральном заседании кафедр: биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, нормальной физиологии с курсом психофизиологии, глазных и ЛОР-болезней, общей и фармацевтической химии, фармакологии с курсом фармации ФДПО, биологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Присутствовало на заседании профессорско-преподавательского состава кафедр 16 человек. Результаты голосования: «за» - 16 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет (протокол № 1 от 07 сентября 2018 г.).

Председатель межкафедрального совещания,
заведующий кафедрой нормальной
физиологии с курсом психофизиологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор



Лапкин М.М.

Подпись профессора Лапкина М.М. заверяю:
проректор по научной работе
и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, доцент



Сусков И.А.