

ОТЗЫВ

официального оппонента о работе Толмачевой Анны Сергеевны
«ОКСИДОРЕДУКТАЗНЫЕ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ
КЛАССА G ЧЕЛОВЕКА»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4 – биохимия

В настоящее время собственная каталитическая (или абзимная) активность антител (АТ) является предметом интенсивного исследования в биохимии и иммунологии. Принято считать, что абзимные АТ появляются главным образом у пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Однако накапливается все больше данных, подтверждающих наличие абзимной активности и у здоровых лиц.

В свете вышеизложенного значительный интерес представляет оксидоредуктазная активность антител и иммуноглобулинов (ИГ).

Начальные исследования в этом направлении подтвердили потенциальную способность ИГ к катализу окислительно-восстановительных реакций. Были обнаружены пероксидазные ИГ, а также ИГ с супероксиддисмутазной активностью. Далее было установлено, что иммуноглобулиновые молекулы, способны катализировать превращение синглетного кислорода в пероксид водорода. Тем самым удалось показать, что АТ существенно влияют на дыхательный взрыв и фагоцитоз – основной иммунологический механизм, обеспечивающий врожденный клеточный иммунитет. В свою очередь, образование активных метаболитов кислорода под влиянием АТ может приводить к повреждению окружающих тканей с развитием иммуновоспалительных и других патологических процессов.

Эти исходные результаты прямо указывают на активное участие АТ и ИГ во всем спектре окислительно-восстановительных реакций, протекающих в организме. Однако во всех подобных исследованиях изучался лишь ограниченный спектр окислительно-восстановительных реакций с узким диапазоном условий их протекания и единичными субстратами.

До настоящего времени не проводилось сравнительное изучение катализа иммуноглобулинами класса G пероксидазных и пероксиднезависимых редокс-процессов, не исследована субстратная специфичность данных реакций, не изучалось влияние различных катионов металлов на их протекание. Получение этих новых данных будет способствовать более глубокому пониманию механизмов абзимных окислительно-восстановительных реакций.

Все вышеизложенное подтверждает **актуальность** настоящего диссертационного исследования.

Диссертационная работа А.С. Толмачевой состоит из общепринятых разделов: Введение, Обзор литературы, Экспериментальная часть (материалы

и методы), Результаты исследования и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы; кроме того, работа содержит Приложение.

Во **Введении** обоснована актуальность проблемы – отмечается значимая роль ферментативных окислительно-восстановительных реакций в физиологических и патофизиологических процессах, протекающих в организме. Одновременно указывается на отсутствие систематизированных данных о свойствах недавно открытых оксидоредуктазных абзимных АТ, участвующих в данных реакциях. Во введении сформулированы цель и задачи настоящего исследования, представлена его научная новизна и практическая значимость, обозначены положения диссертации, выносимые на защиту, отмечен персональный вклад автора в диссертационное исследование, приведены данные о публикациях по теме диссертации и ее апробация на научных конференциях и симпозиумах.

В **обзоре литературы** анализируются современные данные об активных формах кислорода и азота, ферментативных системах их детоксикации (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидазы и др.), антиоксидантах неферментативной природы. Также представлены последние сведения о каталитически активных антителах, возможных механизмах их образования, биологической роли природных абзимов, дана сравнительная характеристика искусственных и природных каталитических антител с оксидоредуктазными активностями. Отмечены нерешенные задачи, связанные с данным направлением исследований.

Содержание раздела **«Экспериментальная часть»** позволяет заключить, что диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне. Дизайн исследования соответствует его целям и задачам.

Раздел включает подразделы **«Реактивы и материалы»** и **«Методы исследования»**. В качестве материалов для выделения ИГ и определения абзимной активности последовательно изучались препараты крови здоровых самцов крыс линии Wistar, препараты сыворотки крови 10 здоровых доноров, препараты сыворотки крови 10 больных системной красной волчанкой (СКВ) и препараты сыворотки крови 11 больных рассеянным склерозом (РС). Диагнозы заболеваний у пациентов были выставлены согласно общепризнанным международным критериям.

Подраздел методов содержит подробное описание широкого набора биохимических и молекулярно-биологических методов, необходимых для выделения препаратов IgG, свободных от примесей; однозначного доказательства принадлежности каталитической активности самим антителам; детальной характеристики оксидоредуктазной активности ИГ в зависимости от источника выделения IgG, параметров их каталитической активности, субстратной специфичности, взаимодействия с катионами металлов. Полнота изложения методов в диссертации обеспечивает возможность их дальнейшего воспроизведения.

При анализе полученных результатов применялись апробированные методы статистического исследования. В работе использован статистический программный пакет Statistica, версия 10.0.

Перед выполнением статистического анализа проводилась проверка данных на соответствие нормальному распределению. В зависимости от ее результатов в дальнейшем применялись либо параметрические, либо непараметрические методы статистики. Соответственно, полученные данные представлены средними значениями и их стандартными отклонениями, либо медианами, верхним и нижним квартилем выборочных распределений изучаемых признаков. Корреляционный анализ проводили по Пирсону или Спирмену. Для сравнения двух независимых выборок применяли тест Манна-Уитни.

В главе «**Результаты и обсуждение**» последовательно приводятся все данные, полученные в ходе выполнения плана диссертационного исследования. Проведен полный цикл экспериментов, подтверждающих принадлежность ферментативной активности антителам – электрофорез в диссоциирующих условиях с окраской нитратом серебра, гель-фильтрация в условиях «кислого шока», определение каталитической активности *in situ* после электрофореза ИГ в диссоциирующем геле, разделение ИГ на цепи и фрагменты с анализом каталитической активности. В последнем случае было установлено, что оксидоредуктазная активность IgG человека связана преимущественно с Fab- и F(ab)₂-фрагментами IgG.

Далее в работе было показано, что пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активность IgG крыс линии Wistar зависит от различных ионов металлов с переменной валентностью. Аналогичные результаты были получены для поликлональных IgG человека, выделенных от здоровых доноров; их активность максимально возрастает под влиянием катионов Cu²⁺ и Mn²⁺. Установлено также, что поликлональные IgG человека обладают широкой субстратной специфичностью и окисляют с различной эффективностью многие субстраты (3,3'-диаминобензидин, α-нафтол, о-фенилендиамин, 5-аминосалициловую кислоту и ряд других). Также было выявлено, что пероксидазная абзимная активность поликлональных IgG, выделенных от пациентов системной красной волчанкой и рассеянным склерозом, достоверно отличается от активности здоровых доноров (выше при СКВ и ниже при РС).

Приведенная в работе интерпретация результатов, полученных автором, аргументирована и обоснована.

В **Заключении** по диссертации заслуживает поддержки итоговое положение автора, что пероксидазная активность IgG может играть весьма важную роль в поддержании редокс-гомеостаза в организме, несмотря на более низкую удельную каталитическую активность IgG по сравнению с классическими ферментами. Данное заключение подтверждается тем, что концентрация IgG в крови очень высока (до 10 мг/мл), и они могут находиться там длительное время (период циркуляции IgG в кровотоке превышает 2 недели).

Выводы диссертации закономерно вытекают из полученных результатов и полностью отражают содержание работы.

В рамках общих требований к оформлению диссертации следует отметить, что изложение работы логично, текст содержит минимальное количество опечаток, ошибок или неудачных выражений, диссертация иллюстрирована цветными рисунками.

В процессе анализа работы возникают отдельные вопросы и замечания, касающиеся ее содержательной части.

Из текста диссертации (разделы «Экспериментальная часть» и «Результаты исследований») не ясно, включался ли этап гель-фильтрации в условиях «кислого шока» в очистку препаратов IgG на постоянной основе, или он использовался лишь как способ доказательства принадлежности каталитической активности антителам? До какого уровня может снижаться исходная оксидоредуктазная активность препаратов IgG после «кислого шока», с чем это может быть связано, и как быстро и полно она восстанавливается?

Чем можно объяснить обнаруженный устойчивый феномен двухфазного возрастания пероксидазной активности антител при последовательном увеличении концентрации ионов металлов с переходной валентностью в реакционной среде? Могут ли аналогичные процессы протекать в условиях *in vivo*?

Дополнительного обсуждения, на мой взгляд, требуют структурные мотивы и механизмы связывания катионов металлов молекулами иммуноглобулинов. Чем может определяться существенная вариабельность металлосвязывающей способности индивидуальных препаратов IgG?

Тем не менее, все вышеприведенные вопросы и замечания носят частный характер и не влияют на итоговую положительную оценку диссертационного исследования.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и работам, опубликованным автором по исследуемой проблеме в высокорейтинговых научных журналах.

Таким образом, представленная к защите диссертация А.С. Толмачевой является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях, в которой решена важная научная задача обнаружения и идентификации абзимов с оксидоредуктазной активностью, выявляемых у здоровых лиц и пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями, с последующей детальной характеристикой особенностей их каталитического действия. Решение этой задачи имеет большое значение для определения места и роли данных АТ как в норме, так и при возникновении аутоиммунной патологии.

В целом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.4 –

биохимия, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Анна Сергеевна Толмачева, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент
доктор медицинских наук, профессор,
зав. кафедрой клинической микробиологии
Витебского государственного ордена Дружбы Народов
медицинского университета


 Генералов Игорь Иванович

Республика Беларусь, г. Витебск, 210009,
пр-кт Фрунзе, д.78, кв.48
тел. сл.+375-(212)-60-14-28 g2@tut.by

Подпись проф. Генералова И.И.
заверяю _____

04 июня 2021 г.

Личную подпись


ЗАВЕРЯЮ
Старший инспектор по кадрам

