

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

Открытие каталитической активности иммуноглобулинов и их способности осуществлять множество различных химических реакций определило рост числа исследований, проводимых в этой области в последние несколько десятилетий. В результате у иммуноглобулинов человека были выявлены различные каталитические активности: ДНК и РНК-гидролизующие, протеолитическая, амилолитическая и нуклеотидфосфатазная. Кроме того, было показано, что поликлональные IgG крови здоровых крыс линии Wistar обладают пероксидазной (зависимой от пероксида водорода) и независимой от пероксида водорода оксидоредуктазной активностью, а IgG больных реактивным артритом, недифференцированным артритом и пациенток с новообразованиями молочной железы обладают каталазной активностью. Также было показано, что IgG пациентов с вирусным гепатитом В, хроническим вирусным гепатитом С, а даже здоровых доноров могут обладать пероксидазной активностью. К сожалению, до настоящего времени не было выяснено, проявляли ли пероксидазную активность непосредственно сами антитела. Также оставались неизученными их ферментативные свойства и субстратная специфичность, значение ионов переходных металлов и металлов с постоянной валентностью для проявления их каталитической активности.

Таким образом, изучение влияния ионов металлов на оксидоредуктазные активности иммуноглобулинов класса G, как и выяснение влияния аутоиммунных заболеваний на каталитические активности антител, стали в настоящее время актуальной задачей направления, посвященного изучению абзимов. Такое положение дел определило формулировку цели диссертационной работы А.С. Толмачевой: исследование пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей природных иммуноглобулинов класса G человека, а также постановку конкретных задач ее исследования, включающих: (i) доказательство, что пероксидазная и пероксид-независимая оксидоредуктазная активности IgG крови у здоровых доноров, больных системной красной волчанкой (СКВ) и рассеянным склерозом (РС) являются свойством антител; (ii) выяснение влияния различных ионов

металлов на ферментативные активности поликлональных иммуноглобулинов класса G у здоровых доноров и сравнение его с влиянием на ферментативные активности IgG крыс линии Wistar; (iii) выяснение и описание субстратной специфичности IgG крови здоровых доноров в реакциях окисления различных соединений; (iv) сравнение эффективности окисления различных субстратов антителами сыворотки крови здоровых доноров и больных СКВ и РС.

Результаты проведенных исследований определили новизну и практическую значимость работы А.С. Толмачевой. Ею с помощью общепринятых в данной области биологии критериев доказано, что выявленные каталитические активности антител являются их собственным свойством. Более того, удалось показать, что пероксидазной активностью обладают Fab- и F(ab)₂-фрагменты IgG. Впервые было показано, что IgG человека обладают широкой субстратной специфичностью и окисляют 3'-диаминобензидин, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислоту), α-нафтол, о-фенилендиамин, гомованилиновую кислоту, 5-аминосалициловую кислоту и 3-амино-9-этилкарбазол. Также было выявлено, что уровень пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей поликлональных IgG в реакции окисления ряда исследуемых субстратов значительно отличается у пациентов с РС и СКВ в сравнении со здоровыми донорами.

Положения, вынесенные на защиту, обоснованы полученными результатами, но они в значительной степени повторяют описание полученных результатов. Вероятно, было бы лучше, если бы представляли собой их обобщение, что позволило бы сократить их число.

Диссертация Толмачевой Анны Сергеевны состоит из следующих разделов: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Экспериментальная Часть, включающая «Реактивы и материалы», «Методы исследования» и «Результаты и их обсуждение», Заключение, Выводы, Список литературы. Работа изложена на 153 страницах, содержит 52 рисунка, 9 таблиц.

В разделе **Введение** достаточно полно и подробно показано состояние дел в исследованиях абзимов, имеющих отношение к данной работе, и обоснована актуальность сформулированной цели работы и задач, решение которых необходимо для ее достижения. В **Обзоре литературы** рассмотрены основные публикации, связанные с выполненной работой. Возможно, некоторым недостатком его является отсутствие в обзоре альтернативных направлений исследований, которые могут проводиться в этой области. В **Экспериментальной Части** («Реактивы и материалы») достаточно подробно и аккуратно описаны использованные в работе реактивы, материалы и методы. Однако, следует отметить,

относительно небольшие выборки пациентов и здоровых доноров, использованных в работе. Возможности выровнять их по возрасту и полу просто не было. О крысах линии Wistar написано лишь, что они были самцами в возрасте 38 месяцев, содержавшихся в стандартных условиях (ИЦиГ СОРАН). Являлись ли они животными из SPF вивария и конвенционального вивария осталось не известным. Также, не ясно почему были использованы животные значительно отличающиеся по возрасту. В **Экспериментальной Части** («Методы исследования») приведено подробное описание методов. Выбор методов сделан в соответствии с существующими общепринятыми в данной области требованиями и критериями, что позволило выполнить работу строго в соответствии с существующими стандартами. В разделе «Результаты и их обсуждение» сами результаты описаны подробно, но их обсуждение могло бы быть более широким и детальным. Использование поликлональных антител делает такое обсуждение достаточно сложным. По многим вопросам оно может быть лишь спекулятивным, но было бы очень интересно узнать мнение соискателя, пусть оно и окажется основанным только на интуиции и на общих биологических принципах. Так, было бы очень интересно узнать мнение автора о причинах быстрого исчезновения каталитической активности антител в экспериментах, результаты которых приведены на рисунках 15, 18. В таких экспериментах выход на плато происходил через 1-3 минуты после начала реакции.

К сожалению, диссертация не лишена некоторых неудачных выражений и небольших неаккуратностей в оформлении. В качестве примеров можно привести следующие предложения: «В связи с вышеперечисленным, **проведено доказательство** принадлежности пероксид-зависимой и пероксид-независимой оксидоредуктазных активностей...» (стр. 57),

В таблице 1 (стр. 61) предполагалось пояснение, обозначенное «**», но оно отсутствует. В таблице 2 приведено «относительное содержание металлов в лиофилизированных препаратах сыворотки крови крыс линии Wistar». Указано, что «ошибка определения по данным двух экспериментов не превышала 5–7%». Однако, остается не ясным как проводилась оценка ошибки, включает ли она все этапы, начиная от забора материала, или только измерение методом САЭМ. Если повтор включает только измерение методом САЭМ, то оценка ошибки не является корректной. На странице 72 автор пишет «В невосстанавливающих условиях наблюдалась одна белковая полоса с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, соответствующая интактному IgG (рис. 22, дор. 1, 2), и две белковые полосы с молекулярными массами приблизительно 50 и 25 кДа, соответствующие Н- и L-цепям антител после восстановления (рис. 22, дор. 3, 4)». Полагаю, что без дополнительно анализа имиджа оценка

размера интактного IgG и H- и L-цепей антител после восстановления не может быть сделана с такой точностью даже с оговоркой «приблизительно». Однако, какие-либо пояснения, как проводилась оценка размера интактного IgG и H- и L-цепей антител, отсутствуют.

На странице 72 написано «В то время как образцы сыворотки характеризовались высоким содержанием Mg, относительное количество этого металла, связанного с антителами, было очень низким (таблица 3)». Данные, приведенные в таблице 3, позволяют предположить, что оно было ниже детектируемого уровня.

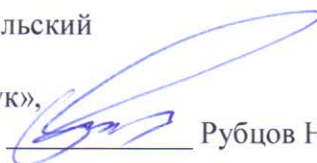
На странице 74 «В присутствии KCl величины кажущихся k_{cat} варьировали в диапазоне 12,1–260 мин⁻¹ и были в 0,61–3,0 раза ниже значений $k_{cat}...$ ». Что значит ниже в 0,61 раза, является загадкой.

В заключении необходимо отметить, что, несмотря на высказанные небольшие замечания и отмеченные небольшие недостатки, имевшие место при написании текста, диссертационная работа Толмачевой Анны Сергеевны представляет собой качественное законченное квалификационное исследование. Сделанные замечания не носят принципиального характера, не умаляют достоинств работы и не влияют на ее общее восприятие. **Выводы** полностью и объективно отражают полученные результаты. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работам по исследуемой проблеме. Список опубликованных работ по теме диссертации включает 5 статей, из которых 4 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Материалы диссертации представлены на конференциях: VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019). Основные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии.

Таким образом, представленная к защите диссертация Толмачевой А.С. является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях, в которой решена задача по детальному описанию пероксидазной и пероксид-независимой оксидоредуктазной активностей природных иммуноглобулинов класса G человека. По актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация полностью 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, Толмачева Анна Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Главный научный сотрудник
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
доктор биологических наук, профессор



Рубцов Николай Борисович

Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, д. 10
тел. сл.+7-383-363-49-81 rubt@bionet.nsc.ru

Подпись Рубцова Н.Б. заверяю
Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН



к.б.н. Орлова Г.В.

26 мая 2021 г.

