

**Отзыв официального оппонента Хомутова Алексея Радиевича  
о диссертационной работе Яны Владиславовны Макаровой на тему:  
«Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с  
использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток РС12»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 03.01.04 Биохимия**

Диссертационная работа Я.В.Макаровой посвящена изучению биологических свойств новых компонентов из ядов различных видов змей с использованием культуры клеток РС12. Яды змей применяются в медицине с древних времен, но их лечебные эффекты и дозы устанавливались и подбирались методом проб и ошибок. Благодаря совершенствованию биологических и химических методов исследования, в частности развитию методов жидкостной хроматографии и методов белковой химии, стало возможно разделить цельный яд на отдельные компоненты, выделить индивидуальные токсины, установить их структуры и раскрыть механизмы их воздействия, как на уровне целого организма, так и на уровне клетки и клеточных структур. Так были выявлены уникальные свойства многих компонентов ядов, обладающих избирательным действием на различные биологические структуры, что способствовало их широкому применению в качестве инструментов исследования биологических процессов, а также для создания на их основе целого ряда фармакологических препаратов. Хотя исследования биологических свойств змеиных ядов и их компонентов ведутся достаточно давно, большая часть этих исследований проведена или на целых организмах, или на препаратах клеточных органелл. Влияние компонентов ядов на уровне целой клетки изучено не столь детально, поэтому данная работа является актуальной и наряду с научной новизной несет в себе научно-практическую составляющую, значимую для современной биохимии и практической медицины.

Диссертационная работа Я.В.Макаровой написана по традиционной схеме и включает в себя: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и обсуждения, заключение с выводами и список литературы.

Обзор литературы, в основном, посвящен описанию трех семейств белков (металлопротеиназы, трех-петельные токсины и фосфолипазы А2), обнаруженных в ядах змей. Представители именно этих семейств были исследованы в ходе выполнения данной работы. Подробно описаны структуры, свойства и механизмы действия этих белков. В обзоре литературы уделено внимание и практическому применению компонентов змеиных ядов в медицине. Литературный обзор написан, как и вся диссертация, хорошим русским научным языком, занимает 52 стр. и включает в себя 183 ссылки. Литературный обзор хорошо соответствует теме диссертационной работы и в связи с большим разнообразием биологических свойств белков этих семейств представляет собой и самостоятельный интерес. К очевидным достоинствам литературного обзора следует

отнести то, что Я.В.Макарова не только творчески и критически описывает литературные данные, но и, анализируя их, намечает перспективные направления исследований в данной области, часть из которых ей и была успешно реализована в ходе выполнения диссертационного исследования.

Объектом экспериментальных исследования Я.В.Макаровой служит линия клеток PC12 феохромоцитомы крысы, представляющая собой опухолевые клетки с уникальной способностью к дифференцировке в нейроноподобные клетки. Исследования процессов дифференцировки и ее нарушений у нейронов крайне актуальны для медицины, в частности для понимания механизмов возникновения нейродегенеративных заболеваний и нейрональных повреждений.

Из ядов различных змей с использованием линия клеток PC12 были выделены и исследованы белки, принадлежащие к трём семействам: оксиагин (семейство металлопротеиназ); мономерные, гомо- и гетеродимерные трехпетельные токсины (семейство трехпетельных токсинов); и фосфолипазы A2 (семейство фосфолипаз A2).

Для изучения этих белков были использованы самые современные методы и методики. Так, для их выделения использовалось несколько видов высокоэффективной жидкостной хроматографии, а характеристика полученных белков была осуществлена с применением различных методов масс-спектрометрии и современных методов белковой химии, включая автоматическую деградацию по Эдману. Цитотоксические эффекты измерялись при помощи МТТ-теста и путем прямого автоматического подсчета кол-ва клеток.

В обсуждении полученных результатов Я.В.Макарова суммирует, логически анализирует данные и приходит к следующим выводам:

- В ходе исследования влияния белков, впервые выделенных из ядов змей, на клеточную линию PC12 было выявлено цитотоксический и дифференцирующий эффекты.
- Под действием металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* клетки PC12 открепляются от подложки и экстрацеллюлярного матрикса, кластеризуются и теряют жизнеспособность.
- Цитотоксины из яда кобры *Naja kaouthia* утрачивают цитотоксическую активность при образовании дисульфид-связанных гетеродимеров с участием альфа-кобротоксина.
- Секретируемые фосфолипазы A2 из ядов кобр *Naja kaouthia* и *Naja haje*, а также гадюк *Vipera nikolskii*, *Vipera ursinii renardi* и *Bitis arietans* стимулируют рост нейритов у недифференцированных нейроэндокринных клеток PC12, то есть приводят к их дифференцировке.
- Сравнительный анализ цитотоксической и дифференцирующей активности фосфолипаз выявил, что из всех испытанных в работе фосфолипаз A2 наибольшей

нейритогенной активностью обладает битанарин, практически не проявляющий цитотоксичности.

- Полученные данные указывают на возможность существования двух механизмов дифференцировки, вызываемой фосфолипазами А2: для первого (вероятно, с участием лизофосфатидилхолина) необходима фосфолиполитическая активность, а второй, в котором, возможно, участвуют протеинкиназы, не зависит от ферментативной активности фосфолипаз А2.

Данные выводы соответствуют поставленным задачам, основываются на полученных данных и логично следуют из них.

Следует подчеркнуть, что в результате выполнения работы автором было впервые изучено влияния металлопротеиназы оксиагина из яда кобры *Naja oxiana* на адгезивные свойства клеток РС12 и впервые была обнаружена способность протеиназ этого типа откреплять эти клетки от субстрата с последующей их кластеризацией. Изучение выделенных из яда кобры *Naja kaouthia* природных гетеродимерных форм трехпетельных токсинов, содержащих цитотоксин и альфа-кобратоксин, впервые показало полное отсутствие цитотоксической активности у гетеродимеров. Также впервые была установлена способность фосфолипаз А2 змеиных ядов вызывать дифференцировку клеток РС12.

Таким образом, автором получены новые данные, которые способствуют пониманию механизмов гибели и дифференцировки клеток под действием белковых компонентов змеиных ядов. Поскольку металлопротеиназы и фосфолипазы А2 являются компонентами клеток, полученные результаты могут свидетельствовать о возможном участии этих клеточных ферментов в процессах, индуцируемых белковыми компонентами змеиных ядов.

В целом диссертационная работа оставляет благоприятное впечатление, однако при ее прочтении возникли следующие замечания и вопросы:

- раздел «2.5.1. Общепринятая классификация» литературного обзора, по-видимому, содержит избыточную информацию о фосфолипазах А2 – такое подробное описание не представляется необходимым.
- в разделе «4.2 Новые трехпетельные токсины» на стр.75-79 большое число заимствованных рисунков и результатов.
- данные табл.7 («Результаты и обсуждение») можно было объединить с данными табл.8.
- на рис.20 стр. 91 у фосфолипазы СМ2 нейритогенная активность ниже, чем у нее же на рис.23 стр. 97. С чем это связано ?

Следует, однако, отметить, что указанные выше замечания не являются принципиальными, носят скорее рекомендательный характер и не снижают значимости

полученных результатов. Работа представляет собой хорошо сбалансированное и тщательно выполненное многоплановое исследование, выполненное на хорошем экспериментальном уровне. Выполнение диссертационной работы потребовало от Я.В.Макаровой использование целого арсенала подходов и методов, а также обработку большого объема экспериментальных данных – личный творческий вклад автора в изучаемую проблему очевиден.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах и получен один патент. Результаты работы были представлены на отечественных и зарубежных конференциях:

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Макаровой Яны Владиславовны «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток РС12», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней», утверждённом Постановлением Правительством Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842, и профилю диссертационного совета Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Работа отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.  
Адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32  
Тел.: 8-499-1356065, e-mail: alexkhom@list.ru  
доктор химических наук,  
специальность 03.01.03 молекулярная биология  
Хомутов Алексей Радиевич

Подпись д.х.н. Хомутова А.Р. завершено

Ученый секретарь ИМБ РАН

к.в.н.,

Бочаров А.А.

Тел.: 8-499-7839045

25.04.2016

