

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Яны Владиславовны Макаровой на тему: «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток РС12», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия

Представленная диссертационная работа Я.В. Макаровой посвящена исследованию действия выделенных из ядов змей белковых компонентов на клетки линии феохромоцитомы крысы РС12. Как известно яды змей имеют сложный состав, который зависит от вида змей, ее возраста, питания и целого ряда других факторов, и содержат в основном белково-пептидные соединения. Эти соединения обладают высокой биологической активностью и специфически воздействуют на различные органы и системы живых организмов. Такие уникальные свойства не могли не найти практического применения. Прежде всего, следует отметить применение токсинов для исследования механизмов различных биологических процессов, происходящих на клеточном уровне, поэтому их вклад в фундаментальную биохимию неоспорим. Так, к примеру, альфа-нейротоксины яда крайтов и кобр были использованы и продолжают использоваться для выделения и изучения никотиновых холинорецепторов. Существуют также перспективы применения этих белков в фармакологии и прикладной медицине. Они могут выступать в качестве основы для создания лекарственных препаратов при таких заболеваниях как рак, сердечнососудистые, нейродегенеративные и аутоиммунные заболевания. С каждым годом открывается все больше возможностей различных компонентов змеиных ядов, которые могут привести к разработке новых эффективных лекарственных препаратов. Следовательно, предпринятое в данной работе исследование является весьма актуальным.

Диссертационная работа выстроена по стандартному плану: теоретическая часть, состоящая из введения и литературного обзора, экспериментальная часть, включающая в себя материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение с выводами, список сокращений и список цитируемой литературы.

В разделе «Введение» автор кратко обосновывает актуальность и значимость проведения исследований, явившихся предметом представленной работы. Автор описывает цель данной работы – анализ биологической активности белков змеиных ядов, относящихся к различным структурно-функциональным семействам, с использованием линии нейроэндокринных клеток РС12, и очерчивает круг задач, выполнение которых было необходимо для достижения цели.

Литературный обзор в основном посвящен описанию компонентов из ядов различных змей. В начале дается общее представление о разнообразии состава змеиных ядов, и особенностях и механизмах их воздействия на живой организм. Далее автор детально описывает структуры и механизмы действия отдельных компонентов и уделяет достаточное внимание их практическому применению и медицинским аспектам. Обзор дает довольно полное представление о современном состоянии исследований в данной области.

Раздел «Материалы и методы» в экспериментальной части содержит достаточно полное изложение использованных методик, которые могут быть воспроизведены по приведенным описаниям. В диссертационной работе Макаровой Я.В. применялся разносторонний подход к изучаемым проблемам и был использован широкий арсенал современных методик.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор анализирует полученные результаты и логически выстраивает закономерные выводы. Прежде всего, следует отметить, что из минорных компонентов ядов змей выделены и исследованы новые белки, принадлежащие трем различным семействам: металлопротеиназы, трёхпетельные токсины и фосфолипазы А2. Так, при исследовании действия выделенных из ядов белков на клетки РС12 было выявлено два основных эффекта: цитотоксический и дифференцирующий. Цитотоксические эффекты наблюдали у представителей металлопротеиназ и трёхпетельных токсинов. Представители семейства трёхпетельных токсинов демонстрировали различную степень цитотоксичности. Наибольшую активность такого типа проявляли цитотоксины.

Хочу выделить основные результаты диссертации, отличающиеся **научной новизной**:

- 1) Впервые показано, что металлопротеиназа оксиагин приводит к гибели клеток РС12, открепляя их от субстрата.
- 2) Впервые обнаружен факт, что гетеродимеры цитотоксина и альфа-кобратоксина не токсичны для клеток РС12, несмотря на наличие цитотоксина в составе димера.
- 3) Для змеиных фосфолипаз А2 впервые показано, что помимо различных цитотоксических эффектов, они еще проявляли способность вызывать дифференцировку клеток РС12.

Автор проводит анализ семи фосфолипаз А2, сравнивая их цитотоксические ферментативные и дифференцирующие эффекты, и выдвигает предположение об альтернативном механизме нейритогенного действия некоторых фосфолипаз А2.

Следует отметить, что полученные автором результаты, расширяют представление о механизмах клеточной гибели и дифференцировки, вызываемых компонентами змеиных ядов.

Прочтение данной работы оставляет в целом благоприятное впечатление, однако она не свободна от некоторых недостатков. В частности, можно отметить следующее:

- 1) В связи с большой по объему информативной составляющей данного исследования и широким спектром изучаемых компонентов охватить в полной мере данную проблематику представлялось трудной задачей. На мой взгляд, в работе очень большой литературный обзор, который занимает более 50% объема диссертации. Автор увлекался деталями: так, например, предположительному механизму действия цитотоксинов уделено слишком много внимания. Также, возможно, чересчур много написано про фосфолипазы A2 не змеиного происхождения.
- 2) При исследовании гетеродимерных трехпетельных токсинов, цитотоксичность измеряли с помощью МТТ-теста. Для чего клетки подсчитывали еще и методом окрашивания трипановым синим?
- 3) При исследовании фосфолипаз A2 можно заметить, что цитотоксичность и ферментативная активность не коррелируют между собой. Так у SM2 и битанарина близкая ферментативная активность, но при равных высоких концентрациях цитотоксичность у битанарина отсутствует. Есть ли этому объяснение?
- 4) Гипотеза о неферментативном нейритогенном воздействии некоторых фосфолипаз A2 интересна и требует тщательной верификации и дополнительных исследований.

Вместе с тем, все высказанные выше замечания не влияют на важность полученных результатов и достоверность сделанных выводов.

По теме диссертации было опубликовано 4 статьи, в рецензируемых журналах и получен один патент. Работа представляет собой хорошо спланированное и, тщательно выполненное многоплановое научно-квалификационное исследование. Работа выполнена на хорошем экспериментальном уровне, актуальность и научная новизна очевидны, а достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, все они подтверждены экспериментальными данными. Текст автореферата полно отражает основные экспериментальные результаты и выводы диссертационной работы.

Диссертационная работа Макаровой Яны Владиславовны «Биологическая активность новых компонентов змеиных ядов: анализ с использованием культуры трансформированных нейроэндокринных клеток PC12», 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 Правительства 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 заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Официальный оппонент

Чеботарева Н.А.

Адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект д.33, строение 2

Тел.: 8(495) 952-25-47; e-mail: chebotareva@inbi.ras.ru

Федеральное государственное учреждение

«Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук»

Ведущий научный сотрудник лаборатории

структурной биохимии белка, доктор биологических наук

по специальности 03.00.04 - Биохимия

Подпись д.б.н., Чеботаревой заверяю

Ученый секретарь

ФИЦ Биотехнологии РАН

к.б.н. **Орловский А.Ф.**

Тел.: (495)-954-4007

e-mail: orlovsky@inbi.ras.ru



Дата: 22.04.2016