

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
(ИЭФБ РАН)**

пр. Тореза, д. 44, г. Санкт-Петербург, 194223
тел.: 552-79-01, факс: 552-30-12
e-mail: office@iephb.ru, http://www.iephb.ru
ОКПО 02698559, ОГРН 1027801535728
ИНН/КПП 7802038273/780201001

23.10.2024 № 1/696

На №

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И. М. Сеченова
Российской академии наук



/ М.Л. Фирсов /

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова
Российской академии наук на диссертацию Юриной Любови
Владимировны «Окислительная модификация фибриногена: влияние на
структуру и функцию», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика**

Актуальность проблемы.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Юриной Л.В. посвящена актуальной медицинской проблеме сердечнососудистых нарушений, обусловленных воспалительными процессами и реакциями тромбоза. Внеклеточная антиоксидантная система крови не позволяет в полной мере защитить белки плазмы от воздействия окислителей. Важнейший белок системы гемостаза фибриноген, играет также достаточно важную роль в регуляции ряда воспалительных реакций. Высокий уровень фибриногена является маркером провоспалительного состояния, а модификация фибриногена при его окислении может повлиять на такие патологические состояния как гипертония и атеросклероз. Безусловно, исследования посттрансляционных модификаций фибриногена при окислении, позволяют лучше установить механизмы развития заболеваний, сопровождающихся воспалительными и гемостазными процессами.

Цель диссертационного исследования заключается в выявлении окислительных модификаций и механизмов нарушения функциональной активности фибриногена при окислении, индуцированном озоном, HOCl/OCl^- и перекисью водорода.

Содержание работы. Диссертация Юриной Л.В. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы с изложением результатов работы, заключения, раздела с выводами, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (268 источников). Работа изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 3 таблицы и 17 рисунков. В автореферате изложены все основные положения диссертации.

Во **введении** обоснована актуальность выбранного направления исследования. Формулируются цель и задачи работы. Охарактеризованы научная новизна, практическая значимость работы, методология исследования, а также положения, выносимые на защиту. Отмечен личный вклад автора и обоснована степень достоверности результатов. Дана информация об апробации диссертации.

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором подробно рассмотрена структура молекулы фибриногена и его участие в гемостазных реакциях (образование фибринового геля, взаимодействия фибрин(оген)а с клетками и плазменными белками). Также описана роль фибриногена в развитии заболеваний, сопровождающихся воспалительными процессами. Представлены сведения об активных формах кислорода, окислительных модификациях белковых молекул. Рассмотрены механизмы поддержания стабильности плазменных белков при их окислении.

Вторая глава посвящена экспериментальным методам, на которых базируется диссертационная работа. Представлены методы выделения из плазмы крови фибриногена и других белков (фактора FXIII и Glu-плазминогена). Подробно описаны методы окисления фибриногена озоном, перекисью водорода и HOCl/OCl^- . Охарактеризованы методы оценки окислительных и других модифицирующих реакций белков плазмы. Развернуто представлены методы исследования структуры фибринового сгустка и кинетики плазминового гидролиза гелей.

В **третьей главе** представлено описание полученных результатов и их обсуждение. Представлены данные по **окислению фибриногена озоном**. Показано, что все три полипептидные цепи $\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ и γ окисленного фибриногена сохраняют свою целостность. Выявлено, что в молекуле фибриногена озон взаимодействует с ароматическими аминокислотными

остатками тирозина, триптофана и фенилаланина. Установлено, что степень окислительных изменений боковых цепей аминокислот, уменьшаются в ряду: Met>His>Trp>Tyr>Pro>Lys. Показаны данные о распределении окислительных модификаций по структурным участкам A α (A), B β (B) и γ (B) цепей фибриногена при действии озона. В исследованиях **окисления фибриногена перекисью водорода** по данным электрофореза полипептидных цепей, показано что, независимо от концентрации окислителя, не наблюдается фрагментации белка, и образования ковалентных сшивок его цепей. Методом масс-спектрометрии выявлено, что наиболее подвержены окислению перекисью оказались остатки метионина, триптофана и гистидина. Модифицированные в результате индуцированного окисления перекисью аминокислотные остатки были обнаружены во всех трех полипептидных цепях и всех структурных областях молекулы фибриногена, за исключением E области. Локализованные в E области аминокислотные остатки, которые участвуют в связывании тромбина, не были подвержены окислительной модификации, что указывает на сохранение тромбин-связывающих сайтов фибриногена при его окислении. Следующий раздел главы 3 посвящен **индуцированному HOCl/OCl окислению фибриногена**, и влияние этого окисления на структуру и функционирование этого белка. Показано, что окисление фибриногена 10 мкМ HOCl не влияет на кинетику сборки фибрина. Также показано, что кинетика плазминового гидролиза фибриновой сети, образованной из окисленного фибриногена, не отличалась от таковой в контрольном образце. При исследовании фибринового геля, полученного из ФИТЦ-меченного фибриногена, методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии выявлено, что только при концентрации HOCl/OCl выше 25 мкМ наблюдается отчетливое уплотнение геля и уменьшение размера гелевых пор по сравнению с нативным образцом. В **обсуждении** представлены схематические изображения полипептидных цепей фибриногена с детектированными окислительными модификациями. Показано, что модифицированные аминокислотные остатки присутствуют во всех трех полипептидных цепях фибриногена. Наименьшее количество центров окисления выявлено в γ -цепи, а наиболее окисленными структурными участками являются D области молекулы. Представлена 3D-структура молекулы фибриногена с отмеченными остатками метионинов – перехватчиков АФК (активных форм кислорода). Предполагается, что выявление таких остатков метионинов позволяют лучше понять природу сохранения функциональности фибриногена в кровотоке в условиях развития окислительного стресса.

Завершают работу **заключение** и **выводы**, в которых изложены основные результаты работы. Представленные **выводы** полностью соответствуют полученным результатам и подтверждают выдвинутые автором предположения.

Научная новизна исследований и полученных результатов.

Подробно рассмотрена структура фибриногена, и выявлены как реакционные, так и устойчивые участки молекулы фибриногена к окислителям с различной реакционной способностью (O_3 , $HOCl/^-OCl$ и H_2O_2). Впервые показано, что центральная E область фибриногена наиболее устойчива к окислению, в то время как периферические D и αC -области молекулы фибриногена уязвимы к действию окислителей. Показано, что наиболее функционально значимые сайты фибриногена ("funnel shaped" домен, сайты "knob A: hole a" и D-D интерфейс) толерантны к действию окислителей, а окислительная модификация ряда остатков метионина не влияет на функциональные свойства этой молекулы.

Теоретическая и практическая значимость.

Развернутое исследование посттрансляционных модификаций фибриногена *in vitro* дает существенное понимание вклада окислительных процессов при образовании аномальной структурной организации фибринового геля и последующем замедлении его лизиса. Исследования также важны в понимании процессов адаптации плазменных белков к воздействию различных окислителей, в условиях, когда плазменная антиоксидантная система крови не позволяет защитить эти белки. Материалы диссертации представлены автором в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных конференциях, форумах и конгрессах. Основные положения диссертационного исследования отражены в 20 научных публикациях: из них 7 в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и 13 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. При выполнении исследований использован комплекс современных инструментальных методов (ВЭЖХ-МС/МС, спектрофотометрия, упругое светорассеяние, электрофорез, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия). Результаты описаны детально, сопровождаются иллюстративным материалом. Для обработки результатов использован современный статистический аппарат. Теоретические положения

согласуются с экспериментальными данными, в том числе с результатами других исследователей.

Вопросы и замечания к работе.

1. В работе проводятся исследования окислительной модификации фибриногена при действии трех индукторов: озона, перекиси водорода и гипохлорита. При разном виде индуцирования исследуются разные аспекты модификации фибриногена. Есть ли принципиальное различие действия на структуру фибриногена этих окислителей или они только различаются степенью воздействия?

2. В диссертации показано, что наиболее подверженными окислительной модификации структурами фибриногена являются α C-области и D-области. Известно, что агрегация тромбоцитов осуществляется за счет связывания C-конца γ -цепи фибриногена с активированными интегринами α IIb β 3. Есть ли данные у автора работы или сведения о данных других исследователей, в которых прослеживается влияние окислительной модификации фибриногена на агрегацию тромбоцитов?

Заключение

Диссертационная работа Юриной Любови Владимировны «Окислительная модификация фибриногена: влияние на структуру и функцию», представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для биологии и медицины. Диссертация отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Юрина Любовь Владимировна заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Отзыв подготовлен заведующим лаборатории «Клеточные механизмы гомеостаза крови» ИЭФБ РАН, главным научным сотрудником, доктором биологических наук (03.03.01 – физиология) Миндукшевым Игорем Викторовичем. Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории «Клеточные механизмы гомеостаза крови» 10.10.2024, протокол №1/10.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук

Почтовый адрес: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д.44

Телефон: +7 (812) 552-79-01

Адрес электронной почты: office@ierphb.ru

Заведующий лабораторией «Клеточные механизмы гомеостаза крови» ИЭФБ РАН,
д.б.н.

 Миндукшев И.В.

Подпись г.н.с., д.б.н И.В. Миндукшева заверяю:

Ученый секретарь ИЭФБ РАН,
к.б.н.

 Гальперина Е.И.



Подпись ученого секретаря
зак. секретаря
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук



