

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
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 темы исследования

В последнее десятилетие действие активных форм кислорода и окислительный стресс являются одной из активно изучаемых проблем во всем мире. Известно, что активные формы кислорода имеют большое значение в ряде нормальных физиологических процессов, таких как регуляция путей внутриклеточной сигнализации. Они также вырабатываются нейтрофилами и играют роль в иммунной защите организма. Однако существует большое количество исследований, которые связывают избыточное количество активных форм кислорода с различными патофизиологическими состояниями. Так, есть данные, что активные формы кислорода действуют на клетки крови тромбоциты, вызывая их активацию и агрегацию, эритроциты, клетки эндотелия сосуда и нейтрофилы, вызывая нетоз, что, в совокупности, приводит к увеличенному риску тромбозов.

Одним из возможных механизмов действия активных форм кислорода является модификация аминокислотных остатков, что ведет к изменению структуры и/или функции белка. В частности, окислительная модификация белков, участвующих в каскаде свертывания крови, приводит к состоянию гиперкоагуляции, и изучение таких модификаций остается крайне актуальным для понимания механизмов развития тромбозов.

Диссертационная работа Юриной Любови Владимировны посвящена определению *in vitro* окислительных модификаций белка плазмы крови фибриногена, возникающих при воздействии на него активных форм кислорода, а также изучению влияния этих модификаций на функционирование фибриногена.

Фибриноген является одним из основных белков каскада свертывания крови. Он активируется тромбином с образованием белка фибрина и полимеризуется, в результате чего формируется трехмерный фибриновый сгусток из разветвленных фибриновых нитей. Полимеризация фибрина и его взаимодействие с тромбоцитами и эритроцитами необходимо для формирования стабильного гемостатического тромба, важного для эффективной остановки кровотечения при повреждении кровеносного сосуда. Окисление фибриногена может приводить к его деградации, изменению структуры и нарушению функции, что может влиять на структуру, формирование и лизис фибринового сгустка как в физиологических состояниях, так и в патофизиологических. И хотя окислительные модификации фибриногена активно изучаются, данные о роли конкретных аминокислотных остатков в антиоксидантной защите фибрина и изменении структуры фибринового сгустка остаются ограниченными и в некоторых случаях противоречивыми.

Всё вышесказанное обуславливает актуальность настоящей работы.

Научная новизна работы

В настоящей работе было проведено широкомасштабное исследование окисления фибриногена тремя вариантами активных форм кислорода, O_3 , $HOCl/OCl^-$ и H_2O_2 , в различных концентрациях и определены аминокислотные остатки, подверженные модификации. Было определено процентное содержание окисленных и неокисленных остатков в белке, а также области белка, наиболее подверженные окислению и наиболее резистентные. Было оценено влияние разных концентраций окислителей на целостность молекул фибрина, структуру фибриновых сгустков и их лизис, а также впервые сделано предположение об антиоксидантной роли остатков метионина в фибриногене.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Обнаруженные в ходе работы модифицированные аминокислотные остатки и их сопоставление с происходящими изменениями функциональной активности фибрина позволяют сделать предположение о роли этих остатков в функционировании белка, его полимеризации и лизисе фибринового сгустка. Также результаты позволяют предположить механизмы нарушения функционирования фибрина при заболеваниях, ассоциированных с окислительным стрессом.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечена согласованностью полученных данных с опубликованными ранее результатами. Использование современных и надежных экспериментальных методов обеспечивает надежность полученных результатов.

Общая характеристика и содержание диссертации, соответствие специальности

Диссертационная работа изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 17 рисунков и 3 таблицы. Работа состоит из введения, трех основных глав, посвященных литературному обзору (глава 1), использованным материалам и методам (глава 2), описанию результатов и их обсуждению (глава 3), заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы из 268 источников.

Во введении была описана актуальность исследования, сформулированы его цели и отдельные задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимости работы, кратко приведены используемые методы исследования, личный вклад диссертанта, перечислены научные публикации диссертанта и научные конференции, на которых работа прошла апробацию. Сформулированы положения, выносимые на защиту.

В главе 1, посвященной обзору литературы, приведена подробная информация о полипептидных цепях и доменной структуре фибриногена, его активации с образованием фибрина и полимеризации фибрина. Подробно описаны сайты связывания активатора фибриногена, тромбина, ионов кальция и сайты, участвующие в полимеризации. Приведены данные о взаимодействии фибриногена с другими белками плазмы крови и клетками. Описаны механизмы стабилизации фибринового

сгустка фактором XIIIa. Дана подробная информация о роли фибриногена в воспалении и его связи с различными заболеваниями. В последнем разделе главы приводится информация об окислении белков активными формами кислорода и продуктах окисления различных аминокислотных остатков, описана роль остатков цистеина и метионина как антиоксидантов. Дан обзор литературы, посвященной окислительным модификациям фибриногена.

В главе 2, посвященной описанию материалов и методов исследования, в первом разделе приведен список используемых материалов. Далее описан набор методик выделения белков плазмы и окисления фибриногена тремя типами окислителя, анализа ковалентных сшивок фибрина фактором XIIIa и продуктов гидролиза плазмином методом ПААГ-электрофореза. Далее приведено описание спектрофотометрического анализа полимеризации и лизиса фибринового сгустка и исследования его структуры методом упругого светорассеяния и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. В последних разделах главы приведены методики подготовки образцов для жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и анализа полученных результатов.

В первый трех разделах главы 3 описаны результаты проведенной работы. При исследовании контрольных и окисленных образцов фибриногена методом ВЭЖХ-МС/МС было показано, что вне зависимости от используемого окислителя количество окисленных аминокислотных остатков и их процентное содержание в фибриногене возрастало с ростом концентрации окислителя. При этом окисленные аминокислоты были обнаружены во всех структурных участках молекулы фибриногена, однако E-область оказалась менее подвержена окислительным модификациям (не подвержена в случае $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ или H_2O_2). Метионины оказались преобладающей мишенью для окислителей. Полипептидные цепи фибриногена сохраняли свою целостность при окислении, как было показано методом ПААГ-электрофореза.

Во втором разделе главы 3 для фибриногена, окисленного H_2O_2 , было показано, что он менее подвержен образованию межмолекулярных ковалентных сшивок под действием фактора XIIIa, а при гидролизе окисленного фибрина плазмином образовывалось больше продуктов гидролиза по сравнению с неокисленным. Однако даже большие концентрации окислителя не оказывали значимого эффекта на структуру фибринового геля.

В разделе 3 главы 3 показано, что окисление фибриногена $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ приводит к зависимому от концентрации замедлению полимеризации фибрина и гидролиза фибринового сгустка. Методом конфокальной микроскопии было показано, что окисление приводит к изменению структуры трехмерной сети фибриновых нитей (ее уплотнению). При окислении фибриногена 10 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ не было отличий в кинетике образования фибринового сгустка и его структуре от контрольного образца.

Раздел 4 главы 3 посвящен обсуждению результатов работы. Показано, что аминокислотные остатки, участвующие в связывании тромбина, не подвергаются окислительной модификации. Обсуждается модификация остатков, участвующих в полимеризации фибрина. Проведено сравнение данных автора с опубликованными ранее данными. Также автор сравнивает модификации, полученные с помощью

различных окислителей. Данные, полученные для низких концентраций $\text{НОС1}^-/\text{ОС1}^-$, позволили предположить, что метионины играют антиоксидантную роль в молекуле фибриногена.

В заключении автор подводит итог проведенной работы. Приведенные выводы логичны, обоснованы, соответствуют поставленным задачам и вытекают из проделанной работы.

В целом, работа производит впечатление законченного исследования. Диссертация написана ясным и грамотным языком, аккуратно оформлена. Иллюстрации очень информативны и хорошо дополняют приведенный текст.

Замечания

Принципиальных замечаний к работе Юриной Любови Владимировны нет, однако имеются минорные комментарии и вопросы дискуссионного характера.

1) В литературном обзоре работы не хватает иллюстративного материала для облегчения восприятия текста. Например, на стр. 19 к цитате «Сгустки, сформированные из фибриногена без αC -области, состоят из более тонких и более плотных волокон, с большим количеством точек ветвления». Также литературный обзор выиграл бы от более подробного рассмотрения участия фибриногена в плазменном звене свертывания крови, в котором он является ключевым участником.

2) Присутствуют небольшие опечатки и стилистические погрешности. На рисунке 8 слишком мелкие подписи, на рисунке 16 не отмечено, для каких концентраций окислителей приведены данные.

3) На рисунке 10 приведены изображения с конфокального микроскопа. Структура фибринового геля сравнивалась только визуально, или применялись какие-либо компьютерные методы?

4) В разделе 3.2.5 было указано, что модифицированные аминокислотные остатки были определены для фибриногена, окисленного 300 мкМ H_2O_2 . Почему была выбрана именно такая концентрация H_2O_2 ? Кажется интересным получение данных и для больших концентраций, учитывая, что ранее в главе было указано, что концентрация H_2O_2 в плазме может превышать 300 мкМ.

5) В разделе 3.1.3 процент окисленных остатков указан без погрешностей, хотя в разделе «Методы» было сказано, что сделаны 3 повторности. Результаты трех повторов были очень схожи?

Однако все написанные выше вопросы и замечания не умаляют высокого качества проделанной работы и не снижают общего положительного впечатления о диссертации как о научном труде высокого уровня, соответствующем специальности 1.5.2. Биофизика

Заключение

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в рецензируемых иностранных и отечественных журналах, входящих в международные базы цитирования и перечень ВАК. Также, результаты работы представлялись на

