



Российский университет
дружбы народов (РУДН)

ул. Минлухо-Маклая, д. 6, Москва, Россия, 117198
ОГРН 1027739189323; ОКПО 02066463; ИНН 7728073720

Телефон: +7495 434 53 00, факс: +7495 433 15 11
www.rudn.ru; rudn@rudn.ru

5 сентября 2018
№ 2019-0300/1409

УТВЕРЖДАЮ
Первый проректор – проректор по научной работе
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
доктор философских наук, профессор Н.С. Кирабаев

«5» сентября 2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» о научно-практической ценности диссертационной работы Дергоусовой Елены Александровны «ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ α 1-СУБЪЕДИНИЦЫ Na,K-АТРаза НА СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. – Биохимия

Актуальность исследования. Na,K-АТРаза (Na-насос) является одним из ферментов, выполняющих множественные функции. Участвуя в переносе ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану клеток животных, этот фермент производит реполяризацию мембраны после проведения нервного импульса, обеспечивает сопряжённый с переносом Na^+ транспорт ряда химических соединений и ионов, участвует в регуляции объёма клетки. Na,K-АТРаза также выполняет рецепторную функцию, инициируя ряд сигнальных каскадов после связывания эндогенных кардиотонических стероидов, таких, например, как убаин. Работа Na,K-АТРаза регулируется различными путями, в частности, путем таких видов модификации её аминокислотных остатков, как фосфорилирование, нитрозилирование, глутатионилирование. В настоящее время глутатионилирование является интенсивно изучаемым процессом посттрансляционной модификации белков. Процесс глутатионилирования представляет собой связывание трипептида глутатиона (γ -глутамил-цистеинил-глицина), являющегося одним из низкомолекулярных антиоксидантов клетки, с SH-группами цистеиновых остатков белков. В условиях окислительного стресса эта модификация может защищать белки от

необратимого окисления и деградации. Вместе с тем ряд белков, в том числе и Na,K-АТРаза, содержат остатки глутатиона и при нормальных физиологических условиях. Изучение роли глутатионилирования Na,K-АТРаза сможет расширить понимание регуляции её функций путем этой модификации, а также позволит улучшить представление о значении роли глутатионилирования в регуляции клеточных процессов при изменении окислительно-восстановительного статуса клеток. В соответствии с вышеизложенным, диссертационная работа Дергаусовой Е.А., посвященная исследованию влияния глутатионилирования α 1-субъединицы Na,K-АТРаза на свойства этого фермента, несомненно является актуальной.

Научная новизна исследования. В рецензируемой работе впервые показано, что при использовании сильных химических восстановителей невозможно полностью удалить глутатион, связанный с α 1-субъединицей Na,K-АТРаза, как у нативного, так и денатурированного фермента.

Показано, что частично деглутатионилированный препарат Na,K-АТРаза в большей степени подвержен трипсинолизу, чем фермент, имеющий исходное глутатионилирование, который выделяется из тканей с нормальным окислительно-восстановительным состоянием. Установлено, что скорость трипсинолиза α 1-субъединицы Na,K-АТРаза после связывания ее с кардиотоническим стероидом убаином, существенно возрастает.

Впервые показана зависимость степени дополнительного глутатионилирования от конформации фермента. Установлено, что фермент, находящийся в конформации E1, наиболее подвержен глутатионилированию, в то время как фермент, находящийся в конформации E2P наименее чувствителен к данной модификации.

Установлено также, что глутатионилирование α 1-субъединицы не влияет на связывание фермента с убаином и белком Hsp70.

Теоретическая и практическая значимость результатов, полученных автором диссертационной работы. Результаты исследования имеют большое теоретическое и практическое значение. Они расширяют существующие представления о регулировании функций Na,K-АТРаза путем модификации глутатионом остатков цистеина ее каталитической субъединицы. Полученные данные могут быть полезны при создании и испытании препаратов, направленные на устранение эффектов гипоксии. Кроме того, данная работа позволяет взглянуть на процесс глутатионилирование как на модификацию, играющую важную роль для внутриклеточного метаболизма.

Структура и содержание работы

Диссертация представляет собой самостоятельное научное исследование, которое соответствует современным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Она написана в соответствии с традиционным планом, изложена на 131 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, списка цитированной литературы, состоящего из 246 источников, и приложения.

Обзор литературы разделён на 2 части. В первой рассматривается Na,K-АТРаза, её структура, изоформы, механизм работы, а также её ингибитор убаин, который выполняет также роль индуктора сигнальных каскадов, и некоторые белки-партнёры. Во второй части рассматриваются посттрансляционные модификации фермента, в частности, глутатионилирование. Далее формулируется цель исследования: выявить влияние исходного и дополнительного глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы на функции Na,K-АТРаза. Для достижения данной цели были поставлены 3 конкретные задачи, которые успешно решены автором.

В разделе «Материалы и методы» детально описаны методы, использованные для выделения препаратов фермента из тканей, определения активности и степени модификации Na,K-АТРаза, а также способы оценки дополнительного глутатионилирования и частичного деглутатионилирования её $\alpha 1$ -субъединицы, схемы постановки ограниченного трипсинолиза и метод измерения кинетических параметров связывания фермента с лигандом и белком-партнёром. Статистическая обработка полученных результатов проводилась по результатам 3-х и более экспериментов, на полученных диаграммах отображалось стандартное отклонение.

В работе показано, что глутатионилирование является модификацией, которая возникает не только при окислительном стрессе, но и в нормальных физиологических условиях. Кроме того, судя по полученным результатам, эта модификация может возникать во время синтеза белка и стабилизировать его структуру. Убедительно продемонстрирован тот факт, что степень дополнительного глутатионилирования зависит от конформации фермента, что может быть важным для более тонкой регуляции его функций. Установлено, что трипсинолиз фермента, находящегося в разных конформациях и имеющего разную степень глутатионилирования, происходит по-разному. Вместе с тем влияния глутатионилирования на связывание Na,K-АТРаза с выбранными лигандом и белком-партнёром выявлено не было. На основании полученных данных автор выделяет несколько типов глутатионилирования и выдвигает предположение о функциональной значимости каждого из них.

В разделе «Заключение» проведено обобщение результатов проведённых исследований и представлены выводы. Все они основаны на достоверном фактическом материале, подвергнутом адекватной статистической обработке, и вытекают из представленных в работе данных. Выводы соответствуют поставленным задачам и положениям, вынесенным на защиту, отражают суть проведённых исследований и являются логическим завершением работы.

В целом диссертационная работа написана грамотно, научным языком и в достаточной мере иллюстрирована.

Вместе с тем, в работе имеются определённые недостатки в форме стилистических неточностей и опечаток. Кроме того, обзор литературы несколько перегружен. Следует указать на не совсем корректное утверждение, что научно-практическая значимость диссертационной работы связана со вкладом результатов диссертационной работы, полученных в основном *in vitro*, в понимание физиологической роли регулирования функций Na,K-АТФазы путем модификации глутатионом остатков цистеина ее каталитической субъединицы при изменении окислительно-восстановительного статуса организма.

Тем не менее, эти замечания не носят принципиального характера и не снижают научно-практической ценности работы.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Диссертационное исследование выполнено с применением современных методов биохимических исследований (для определения активности Na,K-АТФазы применялись колориметрические методы, для анализа степени её модификации – хемилюминисцентные и масс-спектрометрические методы, для анализа связывания лигандов Na,K-АТФазы – метод изометрической калориметрии титрования), использование которых позволило автору адекватно подойти к решению поставленных задач.

В диссертационной работе Дергоусовой Е.А. представлены результаты исследования глутатионилирования и деглутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы, а также влияния глутатионилирования на устойчивость фермента к протеолизу и на связывание с лигандами на примере убаина и с белками-партнёрами на примере шаперона Hsp70. Научная новизна и достоверность полученных в диссертации данных не вызывает сомнений. Результаты диссертационной работы Дергоусовой Е.А., изложенные в научных положениях и выводах обоснованы и достоверны, что обеспечивается высоким методическим уровнем выполнения работы, использованием адекватных поставленным целям и задачам современных методов энзимологических и биохимических исследований.

Представленные в диссертации результаты получены на достаточном количестве экспериментального материала. Выводы соответствуют полученным результатам.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата диссертации Дергоусовой Е.А. «Влияние глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы на свойства фермента» в полной мере отражает основные аспекты диссертационной работы. Цель, задачи, положения, выносимые на защиту и выводы, приведённые в автореферате, соответствуют таковым в диссертации.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, которые в достаточной мере отражают все её положения. Из них 4 работы представляют собой статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК, и 3 публикации в сборниках тезисов научных конференций. Результаты исследования и основные положения диссертации прошли апробацию на научных заседаниях кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, института биохимии им. А.Н. Баха, международных и российских научных конференциях. Сформулированные в диссертации выводы обоснованы, соответствуют поставленным задачам и полностью согласуются с данными экспериментов.

Заключение.

Диссертационная работа Е.А. Дергоусовой на тему: «Влияние глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы на свойства фермента», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия, является самостоятельным законченным исследованием, в котором получены новые данные о процессах глутатионилирования и деглутатионилирования Na,K-АТРазы, а также о влиянии глутатионилирования на такие свойства фермента, как устойчивость к протеолизу и связывание лигандов на примере кардиотонического стероида убаина и белков-партнёров на примере шаперона Hsp70.

По актуальности, научной новизне, научно-практической значимости и уровню выполнения диссертационная работа «Влияние глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы на свойства фермента» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024), предъявляемым к диссертациям на соискание

ученой степени кандидата наук, а её автор - Дергоусова Е.А. достойна присуждения
искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. - Биохимия.

Настоящий отзыв подготовлен профессором кафедры биохимии имени академика
Березова Т.Т. Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы
народов», доктором биологических наук, доцентом Калининой Еленой Валентиновной,
обсужден и утвержден на заседании кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т.
Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
протокол № 1 от 27 августа 2018 года.

Отзыв составили:

Профессор кафедры биохимии имени академика Березова Т.Т.

Медицинского института

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

доктор биологических наук, доцент

03.01.04 – биохимия



Е.В. Калинина

Заведующий кафедрой биохимии имени академика Березова Т.Т.

Медицинского института

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

доктор медицинских наук

03.01.04 – биохимия, 14.01.12 – онкология



В.С. Покровский

Директор Медицинского института

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

доктор медицинских наук, профессор



А.Ю. Абрамов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Российский университет дружбы народов»

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82

e-mail: rector@rudn.ru; rudn@rudn.ru