

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Карапетян Луизы Гарегиновны по теме «Выявление цитруллинированности аденозиндезаминазы в синовиальной жидкости и ее идентификация в качестве нового аутоантигена при ревматоидном артрите», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - «Биохимия»

Проблема инвалидности затрагивает более 1 млрд человек во всем мире. По некоторым оценкам до 190 млн (3,8%) людей в возрасте 15 лет и старше испытывают выраженные функциональные ограничения, в том числе нуждаясь в медицинских услугах. Число людей с инвалидностью растет в связи с увеличением транспортных средств (популярные сегодня электросамокаты и связанная с ними травматизация тому пример), бремени хронических заболеваний и общим старением населения.

Наряду с травматизацией, суставные заболевания (артриты) являются распространенной причиной инвалидности людей в мире. Известно около ста различных форм артрита. Согласно исследованиям, ревматоидный артрит является наиболее распространенной формой, поражающей 0,5-1% населения европейских и североамериканских популяций. Ревматоидный артрит (РА) – это системное хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся деградацией костной ткани и потерей хряща.

В настоящее время особое место отводится ранним диагностическим критериям. Одним из таких показателей при ревматоидном артрите является индекс анти-ЦЦП - аутоантител против циклических цитруллинированных пептидов. Поэтому, обнаружение новых цитруллинированных белков как потенциальных аутоантигенов и выявление аутоантител против них расширит возможности этого открытия как в диагностической так и в клинической ревматологии.

Диссертационная работа Карапетян Л. Г. относится к работам, посвященным исследованию синовиальных жидкостей при суставных заболеваниях.

Целью работы стало выделение из СЖ больных артритом АДА и сравнение степени ее цитруллинированности при различных типах артрита. Автором также была поставлена цель оценить возможность применения цитруллинированной АДА в клинической диагностике в качестве нового аутоантигена.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить АДА-активность в СЖ больных РА, остеоартритом (ОА), реактивным артритом (РеА), анкилозирующим спондилоартритом (АС), ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА) и подагрой.

2. Сравнить уровни высокомолекулярной и низкомолекулярной форм АДА в СЖ при указанных артритах.

3. Получить в высокоочищенном состоянии высокомолекулярную и низкомолекулярную формы АДА из СЖ больных РА, РеА, ОА, АС, ЮИА и подагрой.

4. Выявить и сравнить степень цитрулинированности двух форм АДА при этих артритах.

5. Исследовать возможность ингибирования АДА в СЖ больных РА синтетическими соединениями.

6. Выделить и очистить АДА из легких быка и катализировать его *in vitro* цитруллинирование используя коммерческий фермент ПАД2.

7. Исследовать значение цитруллинирования АДА для его связывания с ДППИV: сравнить взаимодействие ДППИV с очищенной из легких быка АДА нативной и цитруллинированной *in vitro*, а также с цитруллинированной *in vivo* АДА, выделенной из СЖ больных РА.

8. Получить антитела (иммуноглобулин IgG) к цитруллинированной АДА выделенной из СЖ больных РА.

9. Показать применимость полученных антител для выявления цитруллинированной АДА в СЖ, а также возможность использования цитруллинированного АДА в качестве нового анти-ЦЦП индекса.

Аденозиндезаминаза является одним из основных ферментов пуринового обмена, активно участвующим в формировании, созревании и дифференциации лимфоцитов, в образовании лимфоидных узлов. Повышение уровня активности аденозиндезаминазы используется как АДА-тест в дифференциальной диагностике некоторых заболеваний. Целью работы Карапетян Л. Г. было показать, что обнаруженное ранее накопление аденозиндезаминазы в синовиальной жидкости при ревматоидном артрите является следствием цитруллинирования низкомолекулярной формы фермента и, что цитруллинированная низкомолекулярная аденоиндезаминаза является аутоантигеном, стимулирующим выделение специфических аутоантител.

Во введении данной работы диссертант обосновывает выбор исследуемого фермента и круга задач, решение которых направлено на достижение отмеченной цели.

Глава первая диссертационной работы состоит из семи подразделов Литературного обзора. В них процесс цитруллинирования белков представлен как пост-трансляционная модификация белков, в результате которой белки трансформируются в антигены с последующим стимулированием выделения аутоантител, приводящим к развитию аутоиммунных патологий, одной из которых является ревматоидный артрит. Здесь изложены представления о ревматоидном артрите как об аутоиммунном заболевании, перечислены и представлены механизмы действия используемых в современной клинической ревматологии медикаментов, их достоинства и недостатки.

В литературном обзоре приведены данные о роли аденозиндезаминазы при разных патологиях, механизме обострения воспалительных процессов как следствия повышения ее активности.

Структура и содержание литературного обзора свидетельствуют об умении автора работать с литературой и делать необходимые обобщения.

Во второй главе диссертационной работы автором подробно представлена находящаяся в соответствии с поставленными задачами методология, использованная в ее исследованиях. Экспериментальная часть работы Луизы Карапетян выполнена с использованием методов гель-фильтрационной и ионообменной хроматографии для разделения, очистки и исследования взаимодействия белков, флуоресцентной анизотропии, биосенсорного резонанса, компьютерного докинга, а также ряда других аналитических процедур.

В третьей главе работы подробно представлены и обсуждены полученные в рамках поставленных задач результаты исследования. Убедительно, с применением различных подходов, было показано, что увеличение активности аденозиндезаминазы в синовиальной жидкости при ревматоидном артрите сопровождается повышением уровня низкомолекулярной изоформы фермента, в то время, как увеличение активности фермента в синовиальных жидкостях других типов артрита сопровождается повышением уровня ее высокомолекулярной формы. Также было показано, что только при ревматоидном артрите низкомолекулярная изоформа аденозиндезаминазы цитруллинирована и именно это является причиной ее накопления в синовиальной жидкости при исследуемой патологии.

Применяя такие физико-биохимические методы, как зеркального биосенсорного резонанса, флуоресцентной анизотропии и гель-фильтрационной хроматографии, диссертант сравнила взаимодействие дипептидилпептидазы-4 с полученной из легких быка нативной аденозиндезаминазой, ее *in vitro* цитруллинированной формой и *in vivo* цитруллинированной аденозиндезаминазой, полученной из синовиальной жидкости больных ревматоидном артритом. Результаты экспериментов показали, что, цитруллинирование фермента препятствует исследуемому комплексообразованию: в этом случае K_d для связывания белков увеличивается в 4,5 раза.

Далее, Карапетян Л. выделила и довела до электрофоретической степени очистки цитруллинированную аденозиндезаминазу из синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом. При этом было продемонстрировано уменьшение электрофоретической подвижности белка как свидетельство конформационных изменений вследствие его цитруллинирования.

Используя стандартный метод иммунизации кролика, диссертант получила и охарактеризовала специфические антитела (иммуноглобулин *IgG*) к полученному препарату. Затем, методом двойной иммунодиффузии было показано, что цитруллинированная аденозиндезаминаза является аутоантигеном, так как против нее стимулируется выделение аутоантител и, что антитела полученные к цитруллинированной аденозиндезаминазе могут быть применены для ее выявления в различных биологических жидкостях при патологиях аутоиммунной природы.

В заключении дана итоговая оценка полученных результатов, на основании которых автором сформулировано шесть основных выводов, соответствующих поставленным перед ней задачам.

Теперь, касательно замечаний. На мой взгляд, выделение и выявление активности цитрулированной АДА-ы автором должно было быть определено также в плазме и синовиальной жидкости здоровых доноров. Следующее, валидацию фермента стоило производить более таргетными методами, в данном случае, например, Western-blot анализом. Далее, у больных РА наличие и активность фермента стоило определить в крови – это может явиться как диагностическим фактором, так и критерием follow-up.

Отмеченные замечания не носят принципиальный характер, которые могут повлиять на оценку данной диссертационной работы.

Таким образом, обобщая вышеотмеченное, считаю, что диссертационная работа Карапетян Л.Г. соответствует требованиям ВАК РА, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04. - «Биохимия».

Проректор по науке ЕГМУ,
Главный Научный Сотрудник Центра «КОБРЕЙН» ЕГМУ,
Д.б.н., профессор Енкоян К.Б.

Подпись профессора Енкоян К. Б. Заверяю
Ученый секретарь ЕГМУ д.м.н., профессор Авагян Т.Г.

