

О Т З Ы В

Официального оппонента на диссертационную работу

Карапетян Луизы Гарегиновны

**“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”**

Актуальность проблемы.

Диссертационная работа Карапетян Л.Г посвящена изучению патофизиологии ревматоидного артрита (РА), системного воспалительного заболевания соединительной ткани со сложным аутоиммунным патогенезом. РА часто сопровождается повреждением почек, сердечной и легочной тканей, сосудистой и нервной систем, что приводит к быстрой и высокой инвалидности (70%). Однако на ранних стадиях заболевания клинические признаки не специфичны, в то время как его раннее обнаружение и незамедлительно начатое лечение принципиально для профилактики разрушения суставов и коморбидных состояний. До начала или на ранней стадии РА в сыворотке крови обнаруживаются множественные аутоантитела, и на сегодняшний день наиболее прогрессивным тестом на РА является титр антител к циклическому цитруллин-содержащему пептиду. При воспалении в синовиальной жидкости (СЖ) возрастает уровень изоформ пептидил-аргинин дезиминазы, которые посттрансляционно модифицируют аргинин в белках, и изучение цитруллинированных белков как ауто-антигенов весьма актуально для разработки методов анализа, нацеленных на выявление высокочувствительных и специфичных маркеров болезни, которые являются мишенью для аутоантител и могут использоваться в профилактике, диагностике и терапии РА. Это приобретает еще большее значение вследствие значительной клинической гетерогенности РА, которая может стать причиной персонализированной реакции на стандартное лечение и привести к общему неблагоприятному прогнозу. Исходя из вышеизложенного данная диссертационная работа весьма своевременна -она нацелена на поиск аутоантигенов естественного происхождения, и посвящена изучению ключевого фермента обмена пуринов, низкой и высокомолекулярной форм аденозиндезаминазы I (АДА) и их цитруллинирования в СЖ больных разными видами артритов, семь включая РА для использования в качестве дифференциального маркера при этих патологиях. Подобные работы представляют как научный, так и практический интерес, так как

создают основу для клинических исследований и последующих разработок для внедрения в практическую медицину.

Обзор литературы. Анализ литературных данных весьма детальный и интересный, охвачены все темы, затронутые в диссертации. Представлены как современные, так и классические работы, в их числе и выполненные в лаборатории, в которой работает диссертант. Количество глав в обзоре можно было сократить до четырех: в первую главу Аутоимунные болезни включить как подглаву РА — диагностика и биомаркеры, выделенные автором в две отдельные главы; Вторую главу озаглавить Цитруллирование. Цитруллированные пептиды белки. В третьей главе объединить две главы в одну, озаглавленную Аденозин/Аденозиндезаминаза и четвертую главу - Препараты, применяемые при лечении РА.

Материалы и методы. Диссертант использовал широкий спектр самых современных методов биохимии и биофизики необходимых для выполнения поставленных задач. Гельфильтрация, ионообменная хроматография, электрофорез в нативных и денатурирующих условиях использовались при изучении форм АДА1. Методами флуоресцентной анизотропии, биосенсорного анализа и гельфильтрации исследовалось взаимодействие ДППИВ с нативной АДА1 и АДА1 модифицированной *in vitro* и *in vivo*. Освоена методика по получению антител к цитруллинированной АДА и оценка их титра методом двойной иммунодиффузии Оухтерлони. Метод молекулярного моделирования использовался для изучения трансформации структуры ДППИВ-связывающего центра нАДА при цитруллировании Arg142. При этом разработан PyTMs плагин и использовано программное обеспечение PyMOL для визуализации аминокислотных остатков участвующих в образовании Н-связей в непосредственном окружении Arg142. Вызывает удовлетворение подробное описание использованных методов. Все вышеизложенное свидетельствует о всесторонней методической подготовленности автора.

Результаты и обсуждение. Прделана большая скрупулезная и весьма интересная работа. Особо следует подчеркнуть изучение активности АДА, выделение и очистка ее форм из СЖ более чем 400 пациентов при артритах разной этиологии, ибо по сей день не известно какие именно факторы играют решающую роль в их развитии. Диссертант использовал свой подход к их оценке на основе сравнения тотальной активности АДА1 с соотношением активностей ее низко- и высокомолекулярной форм, и выяснил, что повышение активности АДА1 в СЖ больных с РА обусловлено активностью ее низкомолекулярной формы в отличие от других изученных видов артрита.

Впервые продемонстрирована положительная корреляция между соотношением активностей низко и высокомолекулярной форм АДА1 и ее тотальной активностью в СЖ пациентов с РА. Ценно и актуально, что Карапетян Л.Г осуществила сравнительный анализ СЖ в ряде артритов, и выяснила, что цитруллинирование низкомолекулярной АДА1 имеет место исключительно при РА, что открывает перспективы для дифференциальной диагностики артритов.

Цитруллинирование, также известное как деиминирование, будучи одним из вариантов посттрансляционной модификации белков и/или пептидов, при которой остаток аргинина превращается в цитруллин, приводит к потере одного положительного заряда и уменьшению массы на 0,984 Да на модифицированный аргинин. Этот тип модификации может изменять внутри- и межмолекулярные взаимодействия белка оказывая влияние на его структуру, функцию и взаимодействие с другими белками. Исходя из этого диссертантом было детально изучено взаимодействие ДППИВ с низкомолекулярной АДА1 нативной и цитруллинированной в условиях *in vitro*, которое проводила сама Карапетян Л.Г, а также цитруллинированной *in vivo* выделенной из СЖ больных РА. Целый ряд методов: биосенсорного анализа, флуоресцентной анизотропии, а также гельфильтрации достоверно подтвердили влияние степени цитруллинирования АДА1 на соотношение констант диссоциации и ассоциации с ДППИВ и баланс высоко и низкомолекулярной форм АДА. Таким образом, диссертант, используя разные методические подходы, выяснил, что специфичное для РА цитруллинирование АДА1 из СЖ снижает ее сродство к ДППИВ и препятствует образованию с нею комплекса, чем и обусловлено преобладание ее активности в низкомолекулярной форме при РА.

Последовательное сравнительное изучение АДА1 с использованием нативного электрофореза и электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия позволило диссертанту продемонстрировать конформационные изменения в цитруллинированной *in vivo* АДА1 наряду с изменением заряда.

Впервые методом молекулярного моделирования сравнены кристаллографическая и реконструированная структуры нАДА при цитруллинировании аминокислотного остатка аргинина 142, который входит в состав связывающего центра фермента с ДППИВ. Определены значения разных энергетических вкладов при образовании комплексов АДА_{Arg142}-ДППИВ и АДА_{His142}-ДППИВ (Глобальная энергия связывания комплекса, энергии Ван-дер-Ваальсового

притяжения и отталкивания, энергии атомных контактов, водородные и дисульфидные связи. уменьшению глобальной энергии связывания комплекса АДА с ДПП4 и водородные и дисульфидные связи играют основную роль в его стабилизации.

Впервые получены антитела к цитруллинированной АДА1 которые могут использоваться в лабораторных исследованиях, а впоследствии и в клинике для обнаружения последней в органах и тканях и изучения ее участия в патогенезе заболеваний

Таким образом по сути, заложена основа для продолжения работы в направлении изучения функциональной роли модифицированной АДА1 и использования ее в дифференциальной диагностике РА в клинике, а также в качестве прогностического биомаркера развития заболевания и профилактики РА. Перспективно и изучение возможности включения антител к цитруллинированной АДА в фармацевтические препараты для внедрения в медицинскую практику.

В автореферате и публикациях основное содержание диссертации отражено.

Есть некоторые замечания – 1. В материалах и методах не отмечено когда и как получены образцы синовиальной жидкости и исследовали ли ее на инфекцию. 2. На основе каких критериев в клинике «Наири» были диагностированы заболевания (по наличию отека и/или ограничения подвижности или болезненности как минимум в одном суставе, а также по повышенному уровню С-реактивного белка (СРБ) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Средний возраст пациентов, равно как и пол также не отмечены. 3. В графике зависимости логарифма молекулярной массы от расстояния пройденного белком в геле при электрофорезе, на оси абсцисс подвижность следует отметить в см. 4. Виды, а не типы артритов. 5. Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони, а не Ухтерлони. 6. В стат анализе. вместо результаты выражены как средние \pm ст. ошибка предпочтительнее - Результаты представлены как Среднее \pm Стандартная ошибка среднего. Результаты считают статистически достоверными, а не значимыми.

Вышеуказанные замечания не умаляют ценности представленной диссертационной работы.

Есть следующие вопросы:

1. Вы оценивали степень цитруллинированности белковых препаратов по количеству моль цитруллина на моль белка и/или по соотношению оптического поглощения при 530 нм и 280 нм (A530/A280). Насколько возможна такая экстраполяция, проверяли ли ее графически и в каком диапазоне величин.

2. Повышение активности АДА1 за счет высоко- или низкомолекулярной формы при артритах так или иначе снижает уровень аденозина, какую функциональную роль в таком случае играет связывание ее с ДППИВ, если это не отражается на общей активности фермента, равно как при не связывании ее при РА, помимо образования антигена в последнем случае.
3. Можно ли делать вывод что изменение заряда и конформации цитруллинированной АДА1 стабилизируют ее, в отличие от высокомолекулярной формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Карапетян Луизы Гарегиновны “Выявление цитруллинированности аденозиндезаминазы в синовиальной жидкости и ее идентификация в качестве нового аутоантигена при ревматоидном артрите” представляет собой объемное расширенное исследование, которое создает методологическую основу для изучения новых цитруллинированных пептидов и белков предпочтительно в синовиальной жидкости, а не плазме крови, в целях профилактики, диагностики и терапии воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Использован широкий спектр самых современных и разнообразных методов исследования и проделан серьезный и доскональный анализ собственных экспериментальных результатов. Выводы, исходящие из данной работы, соответствуют поставленным задачам и обоснованы. Научная новизна, научно-прикладное значение и перспективность дальнейшего развития и совершенствования настоящего исследования не вызывают сомнений, и представленная работа безусловно заслуживает самой высокой оценки. Из вышесказанного следует, что диссертационная работа Карапетян Луизы Гарегиновны соответствует высоким требованиям, предъявляемыми ВАК РА к кандидатским диссертациям по специальности 03.00.04 – “Биохимия”, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии
института им. Г.Х. Бунятына НАН РА, канд. биол. наук

Н.Х. Алчуджян

Подпись канд. биол. наук Н.Х. Алчуджян

Заверяю:

Ученый секретарь института биохимии
им. Г.Х. Бунятына НАН РА, канд. биол. наук, доцент

