

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук Синицкого Антона Ивановича

на диссертацию Ильичевой Анны Сергеевны

на тему «Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей»

по специальности 03.01.04 – Биохимия на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Актуальность избранной темы

Свободнорадикальное окисление является одним из наиболее важных и универсальных метаболических процессов. В тканях происходит непрерывная генерация активных форм кислорода и азота, обеспечивающая сохранение нормального метаболического фона, необходимого для поддержания функциональной активности клеток. Окислительный стресс является одним из важнейших звеньев адаптации организма на клеточном уровне, а любой патологический процесс закономерно сопровождается изменениями свободнорадикального окисления. В связи с этим метаболические нарушения, сопровождающиеся накоплением прооксидантных метаболитов, имеют наиболее неблагоприятные и разнообразные патологические последствия.

К таким состояниям в полной мере относится гипергомоцистеинемия. К настоящему времени убедительно продемонстрировано, что гомоцистеин, являясь индуктором окислительного стресса, задействован в развитии многочисленных патологических состояний, в основе которых лежит эндотелиальная дисфункция, вазоконстрикция, тромбообразование, усиление митотической активности миоцитов сосудистой стенки. Но высокие концентрации гомоцистеина в подавляющем большинстве исследований, посвященных данной тематике, рассматриваются как маркер и/или предиктор какого – либо патологического состояния. Между тем, конкретные патохимические механизмы формирования изменений во внутренних органах, в частности в мышечной ткани, практически не раскрыты, что в существенной степени ограничивает возможности поиска новых методов коррекции метаболических нарушений при гипергомоцистеинемии.

Окислительная модификация белков (ОМБ), являясь важнейшим звеном свободнорадикального окисления, считается также одной из центральных составляющих протеолитических процессов в клетке, поскольку окисленные белки служат субстратом для протеолитических ферментов. Окисленные белки, помимо утраты физиологических функций или их трансформации, способны выступать в качестве источника свободных радикалов, истощать запасы клеточных антиоксидантов, снижать функции белков электрон-транспортных цепей, активность АТФ-аз, изменять окислительно-восстановительный потенциал митохондриальной мембраны.

Увеличение уровня ОМБ может сформироваться в результате дисбаланса между генерацией и элиминацией карбонилированных белков. Поэтому снижение негативных последствий действия прооксидантных факторов в условиях гипергомоцистеинемии может быть достигнуто путем коррекции как окислительного стресса, так и протеолиза. С этой точки зрения представляют интерес естественные метаболиты, обладающие низкой токсичностью, и вовлеченные в процессы свободнорадикального окисления и протеолиза с одной стороны, и энергетический обмен с другой.

Целью настоящей работы являлась сравнительная оценка состояния окислительного карбонилирования белков и системы лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности, а также исследование влияния карнитина и аргинина на выявленные изменения. Поэтому актуальность представленной работы не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Анализ свыше 270 современных литературных источников, достаточный объем исследования, адекватные поставленным задачам подходы, применение современных методов исследования, соответствие дизайна основным принципам доказательной медицины и тщательный анализ полученных результатов, позволяют признать обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Выводы и положения, выносимые на защиту, сформулированные автором, полностью согласуются с задачами работы и ее целью, и подтверждены адекватным объемом данных. Несомненным преимуществом данной работы является сочетание традиционных методов исследования протеолиза и новых, оригинальных, высокоинформативных методик комплексной оценки карбонилирования белков и резервно-адаптационного потенциала.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обширный объем и характер экспериментального материала, включенного в исследование, соответствует заявленному уровню и специальности диссертации. Достоверность результатов и обоснованность выводов базируется на адекватности экспериментальных моделей, достаточном объеме исследований, корректной статистической обработке результатов.

Исследование характеризуется несомненной научной новизной. Впервые произведена не только комплексная оценка окислительной модификации белков в мышечных тканях при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности, но и продемонстрирована принципиальная возможность ее патогенетической коррекции путем введения аргинина и карнитина. В представленной работе впервые описаны изменения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ

мышечных тканей при гипергомоцистеинемии, показаны их взаимосвязи с процессами карбонилирования белков. Впервые продемонстрировано, что активация системы лизосомального цистеинового протеолиза сопровождается дестабилизацией мембран лизосом в скелетной мышце и миокарде при умеренной, в сердечной и гладкомышечной мускулатуре при выраженной гипергомоцистеинемии.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Автором получены новые научные факты, существенно расширяющие представления о механизмах развития окислительного стресса и его взаимосвязи с протеолизом в мышечных тканях при гипергомоцистеинемии. Поэтому, несмотря на очевидную фундаментальную направленность работы, она имеет достаточно большие перспективы дальнейшей реализации в практике. Разработанные Ильичёвой А.С. положения не только конкретизируют многие патохимические механизмы негативного действия высоких концентраций гомоцистеина в мышечной ткани, но и открывают новые перспективы коррекции изучаемых состояний, подтвержденные экспериментально при использовании аргинина и карнитина.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Результаты исследования могут использоваться для разработки новых методов профилактики и патогенетически направленного лечения метаболических нарушений, возникающих при гипергомоцистеинемии. Полученные результаты также могут стать основой для разработки лабораторных маркеров оценки степени тяжести и прогноза развития осложнений при гипергомоцистеинемии.

Содержание диссертации, ее завершенность.

Диссертация представлена на 150 страницах, имеет общепринятую структуру и порядок изложения материала. Работа написана профессиональным языком, иллюстрирована 32 таблицами и 65 рисунками. Список литературы включает 275 источников, из которых 138 иностранных. Содержание диссертации по изучению роли продуктов свободнорадикального окисления в нарушениях и регулировании метаболических процессов в биосистемах и поиску путей коррекции этих нарушений соответствует заявленной научной специальности - биохимия.

Во введении обоснована актуальность исследования, сфокусировано внимание на неразрешенных вопросах данной проблематике, определены цель, задачи, которые дают представление об основной идее и дизайне работы. Формулировка научной новизны и положений, выносимых на защиту, не вызывает возражений.

Обзор литературы (глава 1) основан на современных литературных источниках, написан весьма обстоятельно и вводит в курс проблемы. В целом, обзор литературы содержит достаточное количество современных данных, дающих исчерпывающее

представление о предмете работы. Раздел «Материалы и методы» (глава 2) дает информацию о методологическом оснащении работы, которое соответствует поставленным задачам. Результаты собственных исследований представлены в третьей главе (Результаты исследования и их обсуждение) и в целом характеризуются систематическим, подробным, логичным и наглядным изложением. Работа завершается заключением, выводами, за которыми следует список литературы.

Все материалы диссертации опубликованы в 10 печатных работах, в том числе в 4 статьях в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертационных работ. Публикации автора имеют научную ценность и полностью отражают содержание научно-квалификационной работы. Результаты исследования и основные положения диссертационной работы были неоднократно представлены и обсуждены на научных конференциях всероссийского и международного уровня. Автореферат отражает основные положения диссертации. В целом работа представляет собой завершённое научно – квалификационное исследование, и заслуживает высокой оценки.

Однако есть ряд замечаний, связанных, в основном, с техническими недочётами. Так, содержание раздела 1.1.2. (глава 1) «Окислительное повреждение белков как возможный фактор формирования сердечно – сосудистой патологии» не вполне соответствует своему названию. Речь идет о различных, наиболее универсальных механизмах и закономерностях образования и удаления ОМБ, а также о последствиях их накопления. В разделе «Взаимосвязь протеолиза и окислительной модификации белков» речь идет в основном об участии протеаз в апоптозе. Описание использованных методов моделирования изучаемых состояний (глава 2) не достаточно наглядно раскрывает принципы формирования экспериментальных групп, а также режимы введения метионина, аргинина, карнитина. Графическое представление корреляционных зависимостей (глава 3) на рисунках №60 – 65, не содержит условных обозначений, поэтому трудно интерпретируется. Некоторые из таблиц (№15, 19 и 32) недостаточно наглядны, содержат опечатки.

При ознакомлении с текстом диссертации возникли следующие вопросы:

1. Почему из всех протеиназ в качестве объектов для изучения выбраны именно катепсины Н и L?
2. Чем обусловлена необходимость использования двух режимов введения метионина при моделировании гиперцистеинемии умеренной выраженности?
3. Существуют ли альтернативные режимы введения и дозирования L – аргинина и карнитина? Если существуют, то чем обусловлен выбор использованных режимов?

4. Пожалуйста уточните, какие методические рекомендации были использованы при получении неседиментируемой и седиментируемой фракций гомогенатов мышечных тканей? При оценке проницаемости лизосомальных мембран?
5. Производился ли корреляционный анализ взаимосвязей между уровнем гомоцистеина в сыворотке крови и другими изучаемыми показателями? Может ли такой анализ позволить сделать дополнительные выводы, связанные с целью работы?
6. Какие выводы о возможных механизмах усиления окислительной модификации белков в мышечной ткани при гипергомоцистеинемии можно сделать, базируясь на результатах ваших исследований?

Таким образом, диссертационная работа Ильичевой Анны Сергеевны на тему «Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи: дана оценка состояния окислительного карбонилирования белков и системы лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности, при введении карнитина и аргинина, имеющей важное значение для медицины и биологии, а именно для биохимии, и соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученых степеней, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

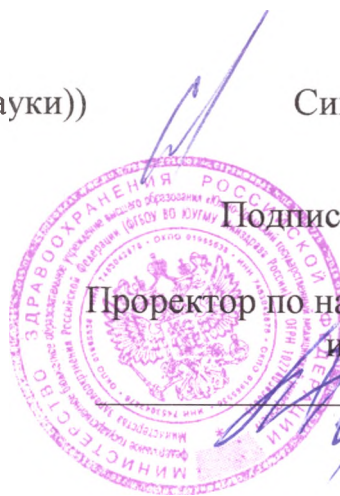
Официальный оппонент:

доцент кафедры фармации и химии фармацевтического факультета
федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

д.м.н.
(03.01.04 – Биохимия (медицинские науки))

Синицкий Антон Иванович

454092 г. Челябинск, ул. Воровского, д. 64
Тел.: +7(904)3073017
E-mail: Sinitskiyai@yandex.ru



Подпись д.м.н. Синицкого А.И.
заверяю

Проректор по научной, инновационной
и международной работе
Л.Ф. Телешева

10.05.2014