

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научно-инновационной  
деятельности Федерального  
государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Воронежский  
государственный медицинский  
университет имени Н.Н. Бурденко»  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации (ФГБОУ ВО ВГМУ  
Минздрава России)

Доктор медицинских наук профессор  
А.В. Будневский

« 25 » апреля 2017г.



**ОТЗЫВ**

### **ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

о научно-практической значимости диссертации Ильичевой Анны Сергеевны «Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

#### **Актуальность работы**

Среди наиболее острых проблем медицинской науки особое место занимают вопросы о механизмах действия активных биологических веществ на организм человека. Среди них особо выделяется метаболическое производное аминокислоты метионина – гомоцистеин, обладающий широким спектром патогенетического влияния на развитие различных заболеваний. Повышение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови инициирует избыточное образование свободных радикалов и, как следствие, развитие оксидативного стресса в различных органах и тканях. Наряду с повреждениями липидов мембран, активные радикалы стимулируют

окислительную модификацию различных белков, которые превращаются в карбонильные производные. Все это сопровождается ингибированием их ферментативной, транспортной, рецепторной и других функций. Удаление опасных для жизнедеятельности клеток модифицированных белков осуществляется различными путями, среди которых, наиболее важным является лизосомальный цистеиновый протеолиз, осуществляемый катепсинами L и H. В этой связи представляет большой научный и практический интерес изучение влияния биологически активных веществ на состояние окислительного карбонилирования белков и системы лизосомального цистеинового протеолиза мышечных тканей при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности.

В качестве веществ, способных влиять на метаболизм гомоцистеина, автором работы были выбраны карнитин и аргинин.

Таким образом, тема диссертации Ильичевой Анны Сергеевны посвященная влиянию гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей в условиях воздействия на организм карнитина и аргинина представляется весьма актуальной и интересной. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы и 65 рисунков.

#### **Характеристика диссертационной работы.**

Диссертационная работа Ильичевой Анны Сергеевны написана по традиционному плану и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Тема диссертации соответствует заявленной научной специальности.

В обзоре литературы автор дает исчерпывающую информацию о влиянии гипергомоцистеинемии на развитие оксидативного стресса. При этом особое внимание уделяется на процессы окислительного повреждения белков. Связь этого процесса с развитием сердечно-сосудистой патологии и другими тяжелыми заболеваниями человека. Уделено достаточно места и в

описании влияний аргинина и карнитина на развитие пероксидных реакций, аминокислотного и энергетического обмена.

Даются сведения о роли цистеинового протеолиза при окислительном стрессе, в частности, о структуре и биохимическом участии в разрушении белковых молекул различных видов катепсинов. Таким образом, литературные сведения, собранные автором и проанализированные в главе 1, непосредственно связаны с темой рассматриваемой диссертации, и позволяют составить адекватные представления по данной проблематике.

Данный раздел создает благоприятное впечатление четкостью и логичностью изложения материала. Список литературы включает 137 отечественных и 138 иностранных источника.

**Глава 2, названная автором «Материалы и методы исследования»** содержит достаточно подробное описание экспериментальных моделей и биохимических методик, которые использовались для решения поставленных задач. Значительное место в этой главе отведено описанию методов определения активности ряда ферментов, участвующих в функционировании антиоксидантной системы, что представляется вполне логичным. Кроме того, диссертант применял и ряд других известных биохимических методик.

Методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам, они разнообразны и включают в себя способы разделения компонентов клеток с помощью центрифугирования. Используются методы спектрофлуориметрии на спектрофлуориметре System 3 Scanning Spectrofluorometr, Opticaltechnologydevices (США). Получение спектров поглощения белков осуществлялось на спектрофотометре СФ-2000. Широко определялись иммуноферментные методы анализа с помощью коммерческих наборов «Axis Shield» (США).

Регистрация динитрофенилгидразонов в световом спектре определялась путем расчета площадей под кривой спектра поглощения окислительной модификации белков. Методика оформлена в виде патента. Следует заметить, что экспериментальная работа была выполнена в

соответствии с нормами гуманного обращения с лабораторными животными.

Достоверность и новизна основных выводов диссертации не вызывает сомнения. Они получены на большом объеме новых экспериментальных данных, воспроизводимых и согласующихся между собой. Достоверность различий в сравниваемых группах опытов доказана путем использования современных методов математической статистики.

### **Новизна исследования и наиболее существенные результаты.**

В представленной диссертационной работе впервые произведена комплексная оценка содержания карбонилированных производных белков в мышечных тканях при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности и при введении на этом фоне карнитина и аргинина. Установлено, что при гипергомоцистеинемии различной степени выраженности возрастает интенсивность процессов окислительной модификации белков в сердечной, скелетной и гладкой мускулатуре. Применение аргинина и карнитина при выраженной гипергомоцистеинемии снижают степень карбонилирования белков.

Впервые показано, что гипергомоцистеинемия провоцирует нарастание активности катепсинов L и H в мышечных тканях. Введение аргинина и карнитина приводит к существенной коррекции указанных изменений в миокарде, с одновременным выраженным нарастанием активности катепсина H в грудной аорте.

Умеренная гипергомоцистеинемия приводит к дестабилизации мембран лизосом в сердечной и скелетной мышцах, а выраженная гипергомоцистеинемия - в миокарде и грудной аорте. При этом аргинин и карнитин обладают способностью стабилизировать лизосомальные мембраны.

В качестве достоинства работы следует отметить значительное число публикаций по теме диссертации (10 печатных работ) в том числе 4-х публикаций в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и в материалах международных и российских конференций. Все они

соответствуют содержанию диссертации.

### **Значимость результатов, полученных в работе.**

Полученные результаты значительно расширяют понимание механизмов влияния аргинина и карнитина на окислительное повреждение белков, тесно связным с этим процессом активность катепсинов L и H, а также на проницаемость лизосомальных мембран в гладкомышечной ткани грудной аорты, скелетной мышцы и миокарда. В целом, это позволяет более целенаправленно использовать данные вещества для коррекции негативных последствий окислительного стресса или его профилактики в мышечных тканях в условиях гипергомоцистеинемии.

Таким образом, выше перечисленные и другие научные результаты исследований, имеющихся в рассматриваемой диссертации, свидетельствуют о несомненной научно-практической значимости выполненной работы.

**В заключении,** диссертантом подведены итоги научного исследования, в котором в сжатом виде обосновываются выводы. Выводы и практические рекомендации соответствуют задачам и в полной мере отражают результаты исследования. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Существенных недостатков у рассмотренной работы не обнаружено, однако к ней имеются отдельные частные замечания и пожелания.

### **Замечания к диссертационной работе.**

1. При рассмотрении разделов литературного обзора обычно читателю демонстрируют те проблемы и вопросы, которые до сих пор остаются не решенными и не исследованными. Таких обобщений нет.

2. В литературном обзоре приводятся данные о способности аргинина снижать содержание гомоцистеина в плазме крови. Тогда непонятна причина повторения подобных исследований автором работы.

3. В литературном обзоре приводятся данные о взаимосвязи между гипергомоцистеинемией и активации NO радикалов, хотя в проводимых исследованиях это воздействие не изучалось.

4. В работе не дано достаточного биохимического обоснования для применения карнитина для решения данной проблемы. Автор ссылается лишь на внешние положительные результаты состояния животных при использовании этого вещества.

5. Не обоснованы выбранные дозы аргинина и карнитина.

6. На стр. 54 демонстрируется повышение уровня гомоцистеина в крови животных под влиянием аргинина. Но далее приводятся данные из литературы, в которых избыток аргинина снижает содержание в сыворотке крови гомоцистеин. При этом автор подчеркивает, что это он и увидел на экспериментальных моделях, т.е. снижение?

7. При оценке отношения первичных и вторичных маркеров в развитии оксидативного стресса не было получено статистически значимых отличий. Однако автор считает возможным обсуждать эти результаты в виде тенденций к изменениям долей этих маркеров относительно контрольной выборки, что не совсем является корректным в научном плане.

8. Не представлена гипотетическая схема биохимического влияния аргинина и карнитина на течение оксидативного стресса белков и активность катепсинов.

9. Нет объяснений в отношении механизма антиоксидантных свойств карнитина.

10. Некоторые таблицы разорваны по страницам, что ухудшает восприятие экспериментального материала.

11. В таблицах 24,28 и 29, а также на рис. 34 - 38 предлагается принимать значение  $p < 0,5$  за достоверный результат.

12. Неудачно составлены рисунки (28,32,38,39,43,45,49,50,51,57,58) в которых размахи доверительных интервалов относительно средней величины контроля и опытов полностью перекрывают друг друга, что говорит о недостоверности полученных данных. Однако статистическая проверка различий действительно демонстрирует представленные различия.

13. Следует считать ошибкой утверждать, что метионин имеет

сульфгидрильные группы (стр.15), вместо цикла мочевины приводится цикл мочевой кислоты (стр.25).

14. Имеются ряд неудачных выражений типа: увеличение «проходимости» тканей (стр. 23), «бессильность сосудистых клеток» (стр. 27), «содержание» эндотериальной NO-синтетазы (стр. 29), «пермеабиллизация» лизосомальных мембран, ... большинство исследований .....связаны с риском развития сердечно-сосудистых патологий ...(стр. 116).

15. На наш взгляд не совсем корректно звучат фразы типа: ...введение аргинина животным приводит к нарастанию площади под кривой спектра поглощения ..... Непонятно, как лекарственное вещество может изменять «площади» ....

16. На рисунках с демонстрациями корреляционных связей нет указаний значений осей абсцисс и ординат.

17. В разделе «заклучение» итог результатов описывается лишь только в виде изменений показателей. Однако биохимическая трактовка взаимосвязей между исследуемыми аминокислотами отсутствует. К сожалению, автор не использует, применяемые в таких случаях, итоговые схемы или рисунки, позволяющие объяснить полученные результаты на молекулярном уровне.

18. К замечаниям можно отнести и наличие грамматических ошибок, повторения одного и того же текста и пропуски слов в тексте (стр. 92).

Однако, все сделанные замечания не снижают положительной оценки рецензируемой диссертации в целом.

Основные положения диссертационного исследования могут быть использованы в преподавании учебных курсов: биохимии, патофизиологии, кардиологии и др.

### **Заклучение:**

Диссертационная работа Ильичевой Анны Сергеевны «Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей» представленная к защите на

