

## ОТЗЫВ

официального оппонента Камилова Феликса Хусаиновича на диссертационную работу Ильичевой Анны Сергеевны «Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04. – Биохимия.

Актуальность исследования. Исследования последних лет позволяют констатировать, что распространенные хронические неинфекционные заболевания – сердечно – сосудистые, онкологические, аутоиммунные и др., а так же ряд воспалительных заболеваний протекают с выраженной гипергомоцистеинемией. Гипергомоцистеинемия в свою очередь провоцирует развитие оксидативных процессов, приводящих к окислительной модификации белков и липидпероксидации, составляющих основу патогенетических механизмов нарушений метаболизма и функционирования клеток и тканей. Адаптационные ресурсы организма на усиление свободно радикального окисления включают не только систему антиокислительной защиты, направленную на противодействие, купирование и блокаду цепных реакции, но и разрушение, и элиминацию продуктов окислительных процессов. Существенную роль в течение последних играют протеолитические процессы, необходимые для деградации и удаления окислительно модифицированных белков.

Диссертационная работа Ильичёвой А.С., посвященная развитию процессов окислительной модификации белков и лизосомального цистеинового протеолиза мышечных белков при оксидативном стрессе, вызванном гипергомоцистеинемией, их взаимосвязи и коррекции, представляется актуальной, имеющей теоритическую и практическую значимость.

### Степень обоснованности научных положений, выводов и заключений.

Достаточный объем исследований, использование современных биохимических методов и аппаратуры, грамотная статистическая обработка результатов убеждают в обоснованности научных положений, сформулированных в представленной Ильичёвой А.С. диссертационной работе. Используемые в диссертации экспериментальные модели и методы исследования базируются на известных и проверяемых фактах. Положения, выносимые на защиту, выводы диссертации определены результатами исследования, соответствуют содержанию работы, поставленной цели и задачам.

Достоверность и научная новизна исследований и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Результаты, полученные в диссертационной работе, а так же выводы, сформулированные диссертантом, обладают необходимой степенью научной новизны.

Результаты проведенных исследований, позволили получить новые данные о накоплении в мышечной ткани продуктов окислительной модификации белков и активности лизосомальных протеиназ L и H, зависящие от выраженности гипергомоцистеинемии. Автором впервые, установлена при гипергомоцистеинемии снижение карбонилирования белков и активности катепсинов L и H при введении аргинина и карнитина, которое имеют особенности в зависимости от типа мышечной ткани. Важно также выявление наличия прямой корреляции между некоторыми показателями интенсивности окислительной модификации белков и активностью катепсина L при выраженной гипергомоцистеинемии.

В целом необходимо подчеркнуть высокий методический уровень работы. Используемые методы информативны, современны и адекватны поставленным задачам. Достаточный объем проведенных исследований, статистическая обработка полученных данных дают основание считать полученные в диссертации и сделанные на их основе выводы достоверными.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации. Результаты работы характеризуют патогенетическую значимость интенсификации окислительной модификации белков и активации лизосомальных цистеиновых протеиназ при гипергомоцистеинемии, сопровождающей развитие ряда хронических и острых заболеваний инфекционного и неинфекционного генеза. Выявленные ингибирующие эффекты карнитина и аргинина на выраженность карбонилирования белков и активность катепсинов в мышечной ткани могут быть экспериментальным основанием для последующей разработки и применения их в целях коррекции отрицательных последствий усиления оксидативных процессов в мышечной ткани при некоторых патологических состояниях.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Положения, сформулированные в диссертации, могут быть использованы в проведении дальнейших исследований по эффективности и особенностям молекулярных механизмов действия аргинина и карнитина при состояниях, сопровождающихся развитием оксидативного стресса.

Результаты работы могут использоваться в учебном процессе по биологической химии и клинической биохимии в учебных заведениях высшего профессионального образования медицинского профиля.

Оценка содержания диссертации её завершенности. Диссертация изложена на 150 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 275 источника, в том числе 137 отечественных и 138 зарубежных. Иллюстративный материал представлен 65 рисунками и 32 таблицами.

Введение изложено в традиционном стиле. Автор освещает актуальность темы, формулирует цель и задачи исследования по оценке влияния гипергомоцистеинемии на окислительное карбонилирование белков и состояние лизосомального цистеинового протеолиза в мышечной ткани и действию на них карнитина и аргинина. Далее диссертант представляет научную новизну, теоритическую и практическую значимость, излагает достоверность полученных результатов исследования, положения, выносимые на защиту для профессионального обсуждения. Введение заканчивается сведениями об апробации результатов работы, публикациях, личном вкладе автора в выполнение работы, объеме и структуре диссертации.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, в котором анализируются данные о гипергомоцистеинемии как состоянии, провоцирующим развитие оксидативного стресса и сердечно – сосудистой патологии, влиянии L – аргинина и карнитина на развитие оксидативного стресса, а так же о цистеиновых протеиназах и роли лизосомального цистеинового протеолиза в оксидативном стрессе.

Материал, представленный в обзоре литературы, свидетельствует о том, что диссертант глубоко изучил современный уровень знаний о предмете своего исследования.

В главе 2 « Материалы и методы исследования» представлены сведения об экспериментальной модели, схемах введения препаратов L- аргинина и карнитина, методах получения биологического материала и определения биохимических показателей и маркёров. Эксперименты выполнены на 80 половозрелых самцах крыс линии «Вистар». В работе использованы современные информативные биохимические методы исследования и оборудование, реагенты известных фирм. Использованные модели, методы исследования, расчёты подробно описаны. Доказательность полученных результатов обеспечена статической обработкой числового материала с

использованием непараметрических методов после предварительного выяснения характера распределения вариационных рядов. Представленный в главе материал говорит о высоком методологическом и методическом обеспечении исследования.

Глава 3 посвящена результатам изучения окислительной модификации белков миокарда, скелетной мышцы и мышечного слоя грудной аорты, общей, неседиментируемой и седиментируемой активности L - и H-катепсинов при умеренной и выраженной гипергомоцистеинемии и влиянии на эти процессы L – аргинина и карнитина.

Предварительно диссертант убедительно показывает, что введение метионина экспериментальным животным в течение 7 и 14 дней приводит к примерно однозначной гипергомоцистеинемии, а введение L-аргинина и карнитина при трёхнедельном введении метионина способствует снижению гипергомоцистеинемии в 3-4 раза.

Изменения содержания окислительно модифицированных белков и активности цистеиновых лизосомальных протеиназ при различной выраженности гипергомоцистеинемии показали довольно сложную картину в разных типах мышечной ткани. Анализ этих результатов позволяет автору прийти к обоснованному заключению, что в миокарде и скелетной мышце происходят интенсификация карбонилирования белков и лизосомального протеолиза, мало зависящих от выраженности гипергомоцистеинемии, а в гладкомышечной мускулатуре - аорты нарастание этих процессов по мере увеличения уровня гомоцистина в крови экспериментальных животных. При этом наблюдалось постепенное повышение уровня карбонилирования белков, что свидетельствует об интенсификации развития окислительного стресса, а изменения состояния протеолиза имели определённые тканевые различия: в миокарде повышалась активность всех фракций катепсина H и особенно проницаемость лизосомальных мембран, в скелетной и гладкой мышце аорты увеличивалась активность обоих катепсинов. В аортальной



стенке активность катепсина L увеличивалась за счет седементируемой и несеедементируемой, а катепсина H, в основном, – цитоплазматической фракций, в скелетной мышце – без изменения стабильности лизосомальных мембран. Проницаемость лизосомальных мембран диссертант контролировал определением коэффициента лабильности для кислой фосфатазы.

Корректирующее действие L-аргинина на эффекты гипергомоцистеинемии в мышечной ткани проявлялось, по данным автора, снижением содержания продуктов окислительной модификации белков и увеличением толерантности белков стенки грудной аорты к процессам карбонилирования. Одновременно в миокарде наблюдалось ингибирование активности протеаз и лабильности лизосомальных мембран, в скелетной мышце данный эффект выявлялся лишь при определении активности катепсина H и несеедементируемой активности катепсина L, в мышце грудной аорты снижалась только активность лизосомальной фракции катепсина L, а активность катепсина H увеличивалась.

Введение карнитина, при выраженной гипергомоцистеинемии, не выявил существенного действия на интенсивность карбонилирования белков миокарда и скелетных мышц, хотя отмечалось положительное влияние на некоторые показатели резервно – адаптационного потенциала. В мышечной ткани грудной аорты карнитин приводил к стабилизации этих процессов. В то же время карнитин снижал лабильность лизосомальных мембран и цитоплазматической фракции катепсина H и L в скелетной мышце и гладкой мускулатуре аорты, однако общая активность катепсина L сохранялась, а катепсина H повышалась за счет несеедементируемого пула.

В заключении диссертант приводит обобщение результатов выполненного исследования. Этот раздел читается легко и с интересом. Диссертант сводит воедино факты и доказательства взаимосвязи гипергомоцистеинемии и уровня окислительной модификации белков мышечной ткани с характером

изменений в ней активности катепсинов L и H, влиянием на эти процессы L – аргинина и карнитина.

Выводы (в количестве четырех) вытекают из сущности исследования, соответствуют цели и задачам работы.

Список литературы составлен в соответствии с требованиями ГОСТ.

#### Достоинства и недостатки содержания и оформления диссертации.

Диссертация оформлена согласно требованиям. В целом она представляет законченный труд. Выполнена на высоком уровне с использованием современных биохимических методов. Содержит новые сведения и значима для медицины и биохимии.

Приведенный анализ позволяет заключить, что представленная работа содержит достаточный для диссертации на соискания ученой степени кандидата медицинских наук объем исследования, позволяющий получить обоснование и правомочные научные положения и выводы, отвечающие требованиям пунктов 5, 10 и 14 паспорта специальности 03.01.04 – Биохимия. В работе решены заявленные цели и задачи исследования.

Замечания и вопросы по диссертационной работе. В целом работа заслуживает высокой оценки. Однако есть ряд замечаний, в основном, технического характера: во введении не приведены данные о внедрении результатов работы; второй и третий разделы обзора литературы не завершаются обобщением опубликованных данных по представленным вопросам, как, например, в первом разделе; во второй главе остается не совсем ясной оценка активности коэффициента лабильности катепсинов L, H и кислой фосфатазы, поскольку имеется ссылка принципа метода на патент 2524667 РФ «Способа комплексной оценки, содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях» от 27. 07.2014 г; в третьей главе «Результаты исследования и их обсуждение» в таблицах не указан объем выборки или численность группы

(n), в главе «Результаты исследования и их обсуждение» практически не обсуждаются данные по влиянию на активность катепсинов введения аргинина и карнитина; в заключении не обобщаются результаты анализа корреляционных связей выраженности карбонилирования белков и активации цистеиновых лизосомальных протеиназ.

Вместе с тем указанные замечания не снижают важности полученных результатов. Считаю, что диссертантом получен новый интересный материал, однако следует в порядке дискуссии уточнить некоторые вопросы:

1. Каков, по Вашему мнению, основной механизм снижения гомоцистеинемии при введении аргинина, и влияние аргинина на окислительную модификацию белков мышечной ткани связан с его непосредственным действием на метаболизм мышц или опосредствованно снижением гипергомоцистеинемии?
2. С чем связаны различия в изменении общей активности фракционного пула L- и H – протеаз в изучаемых Вами тканях при действии одних и тех же факторов?
3. Чем обусловлены тканевые различия ответа миокарда, скелетных и гладких мышц на введение аргинина и карнитина при экспериментальной гипергомоцистеинемии?

Заключение. Диссертация Ильичевой Анны Сергеевны на тему: «Влияние гипергомоцистеинемии на окислительную модификацию белков и активность катепсинов L и H мышечных тканей» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения актуальной научной задачи по характеристике индуцированной гипергомоцистеинемией свободно-радикального окисления белков и лизосомального цистеинового протеолиза в мышечной ткани и путей их коррекции, имеющей важное значение для медицины и биологической химии. Работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения ученых степеней» ВАК,



утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями от 21.04.2016 г. № 335), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент, д-р мед. наук,  
профессор кафедры биологической химии  
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный  
медицинский университет» Министерства здра-  
воохранения Российской Федерации,  
Заслуж. деятель науки РФ и РБ



Ф.Х. Камилов

Камилов Феликс Хусаинович  
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. ФГБОУ ВО  
БГМУ Минздрава России, кафедра  
биологической химии.  
Тел: ректорат 8 (347) 272 41 73;  
E.mail: rectorat@anrb.ru  
кафедра – 8 (347) 272 66 07;  
e-mail: bx-bgmu@yandex.

