

## О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Екатерины Юрьевны Ильичевой «Механизмы влияния ионов серебра на метаболизм меди млекопитающих», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** В настоящее время наблюдается активное использование ионов серебра в хозяйственной деятельности человека, поэтому изучение влияния ионов серебра на организм млекопитающих является особенно актуальным и своевременным. Актуальность представленной работы состоит в том, что Е.Ю. Ильичева подходит к всесторонней оценке влияния вводимых в организм ионов серебра на метаболическую систему меди на основании сходных их координационных свойств. Известно, что медь в организме млекопитающих активно включается в метаболические процессы, участвует в регуляции функциональной активности клеток. Нарушение метаболизма меди приводит к развитию тяжелых заболеваний. В противоположность меди в организме не обнаружено ни одного фермента и ни одного физиологического процесса, связанного с серебром. Исходя из этого, изучение механизмов влияния ионов серебра на метаболизм меди, оценка его конкурирующего влияния за использование транспортных систем, встраивание в активные центры купроэнзимов приводит к нарушению метаболизма меди. Все это позволяет не только проанализировать влияние серебра на метаболизм меди у млекопитающих, но также выявить неизвестные стороны функционирования метаболической системы меди, в частности, отслеживание пути ее транспорта, распределения и депонирования.

В диссертации четко и лаконично сформулирована **цель работы** – изучение гомеодинамики меди у крыс, длительное время употреблявших корм, содержащий ионы серебра. **Задачи** представленной работы логично вытекают из поставленной автором цели.

**Научная новизна** полученных результатов не подлежит сомнению. Автором впервые обнаружено существование альтернативного механизма, обеспечивающего поддержание статуса меди у лабораторных грызунов при

длительном поступлении с пищей ионов серебра. Показано, что степень выраженности влияния Ag-диеты зависит от ее длительности и периода онтогенеза животных. Впервые в сыворотке крови Ag-N180 крыс выявлено снижение концентрации меди и ферроксидазной активности, обнаружено нарушение ее транспорта за счет снижения в печени активности генов, кодирующих синтез белков-транспортеров. Впервые у крыс, получавшихся с пищей ионы серебра, обнаружено изменение третичной структуры и ферментативной активности церулоплазмينا, скорости его секреции в кровотоки. Показана связь этих изменений с периодом онтогенеза животных и длительностью приема серебра.

**Научно-практическое значение** полученных автором результатов. Автором четко показана перспективность использования модели Ag-крысы для фундаментальных исследований транспорта меди, особенности ее распределения в организме и клетках, изучения молекулярных механизмов формирования активных центров церулоплазмينا (ЦП). Данные, полученные при изучении эффектов Ag-диеты на лабораторных животных моделях, послужат основой для рассмотрения серебра в качестве экологического фактора. Они также могут быть использованы для выработки научно-обоснованных рекомендаций по снижению эффекта загрязнения окружающей среды серебром. Все это определяет не только фундаментальный, но и экологический аспект представленной работы.

**Методология и набор методов исследования** указывают на экспериментальный характер представленной диссертации. Работа выполнена на лабораторных крысах с использованием методов классической биохимии и молекулярной биологии. Четко сформулированы основные **положения, выносимые на защиту**, в которых отражено содержание представленной работы.

**Степень достоверности и апробации результатов работы.** Автором представлены четкие доказательства достоверности полученных результатов, обеспеченных разнообразием и адекватностью применяемых методов и их воспроизводимостью, сертифицированностью оборудования и реактивов,



личным участием во всех экспериментах, публикацией материалов диссертации в ведущих отечественных и зарубежных научных журналах, представлением материалов работы в виде устных и стендовых докладов на российских и международных научных форумах.

**Оценка содержания работы и ее завершенности.** Рукопись диссертации построена в традиционном стиле, оформление ее соответствует действующим требованиям. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 264 источника: 18 – отечественных и 246 – иностранных. Результаты работы представлены в 4 табл., иллюстрированы 46 рис.

Во введении диссертации четко сформулирована актуальность и новизна разрабатываемой темы, показана ее теоретическая и практическая значимость для выработки научно-обоснованных рекомендаций по снижению загрязнения окружающей среды серебром. Лаконично сформулирована цель работы. Задачи представленной диссертации логично вытекают из поставленной цели. Положения, выносимые на защиту, отражают содержание диссертационной работы. Литературный обзор охватывает большой объем материала, что свидетельствует о глубоком и всестороннем знании изучаемой автором проблемы. В обзоре литературы обобщены современные данные, отражающие состояние проблемы, согласно поставленным автором цели и задачам работы. Екатерина Юрьевна подробно останавливается на биологической роли меди, освещении механизмов, обеспечивающих транспортировку, распределение, и хранение меди, представлена характеристика основных белков-транспортеров меди, проанализирована роль ионов меди, входящих в состав большой группы купроэнзимов. Автор в своей работе отражает особенности метаболизма меди в процессе развития организма, ее роли в функционировании различных тканей, проведен сравнительный анализ Cu(1) и Ag(1). Целый раздел посвящен характеристике животных моделей, используемых для изучения метаболизма меди, что позволяет в полной мере оценить преимущество используемой автором модели при проведении собственных экспериментальных

исследований. Обзор написан хорошим литературным языком, прекрасно иллюстрирован, читается легко и с большим интересом.

Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современной аппаратуры и современных методов. Автором представлены подробный перечень использованного оборудования, материалов, описание состояния лабораторных животных. Следует отметить четкое изложение и логичное построение раздела, посвященного экспериментальным методам. Подробно описаны методы выделения препаратов белков и нуклеиновых кислот, а также описание получения отдельных субклеточных фракций. Подробно излагаются методы исследования белков с использованием электрофоретического разделения, иммуноблоттинга, иммуноэлектрофореза и выявления активности основных медьсодержащих белков-ферментов. Обращает на себя внимание большой объем описанных в работе методов. Помимо биохимических методов использованы аналитические методы, методы гистологического анализа, физиологические тесты, что позволяет всесторонне оценить полученные экспериментальные данные и служит доказательством достоверности результатов и выводов диссертации.

В экспериментальной части диссертации отражены результаты исследования влияния ионов серебра на процессы метаболизма меди у животных разного возраста. В начале 3-й главы «Результаты и их обсуждение» автором суммирован перечень всех проводимых исследований с использованием соответствующих методов и аппаратуры. Учитывая большой объем проводимых исследований, многообразие используемых методов, это способствует цельному восприятию последующей экспериментальной части диссертации. Автор для исследования влияния ионов серебра на метаболизм меди использовала взрослых животных, получавших с пищей серебро в течение месяца, и крыс, которые находились на Ag-диете со дня рождения до 6-месячного возраста. Е.Ю. Ильичевой четко показано, что у взрослых крыс, получавших с пищей серебро (Ag-A30 крысы), в сыворотке крови резко снижаются оксидазная активность церулоплазмينا и концентрация меди. На основании проведенных исследований автор логично приходит к заключению,



что ионы серебра включаются в молекулу ЦП. Это приводит к нарушению его структуры и потере ферроксидазной активности. При этом активность гена ЦП у этих животных не меняется. Диссертантом выявлено накопление серебра в митохондриях гепатоцитов. Введение этим животным препаратов меди приводит к восстановлению ферментативной активности за счет встраивания меди в апо-ЦП или, как предполагает автор, в Ag-ЦП.

Большой интерес вызывают исследования влияния хлорида серебра на метаболизм меди в период постнатального развития крыс, что дает возможность провести более глубокую оценку влияния Ag-диеты на метаболизм меди в процессе созревания организма. Екатерина Юрьевна обнаружила изменение содержания меди и серебра в сыворотке крови и печени, оксидазной и ферроксидазной активности у животных в разные сроки онтогенеза. Полученные данные позволяют проследить динамику влияния серебра на оксидазную активность ЦП, снижение концентрации меди в печени и аккумуляцию серебра в печени и мозге.

С целью более углубленного анализа полученных данных автор исследует степень экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в раннем постнатальном периоде развития животных. У 40-дневных Ag-крыс в печени выявлено снижение активности генов, ассоциированных с транспортом меди и медь-связывающих белков. Автор отмечает, что у Ag(40)-крыс обнаруженные изменения некоторых показателей метаболизма меди не влияли на их развитие и психо-эмоциональное состояние. Транспорт серебра в организме новорожденных крыс происходит по тем же путям, что и меди и накопление серебра не приводит к дефициту меди в печени и мозге.

Е.Ю. Ильичева проводит сравнительный анализ показателей обмена меди у животных (Ag-N180-крысы), которые со дня рождения принимали серебро с кормом длительное время (6 мес.), с животным (Ag-N30-крысы), которые во взрослом состоянии были переведены в течение месяца на Ag-диету. Обращает на себя внимание более равномерное распределение серебра между внутренними органами и субклеточными структурами гепатоцитов у Ag-N180-крыс по сравнению с Ag-N30-крысами. В цитозоле клеток Ag-N180 крыс

серебро связано с металлотионеином и компонентами, проявляющую супероксиддисмутазную активность.

Одним из важных аспектов представленной диссертации является выявление дополнительной изоформы ЦП при сравнительной оценке очищенных препаратов ЦП из сыворотки Ag-N30 и Ag-N180. Проведенный тщательный анализ свойств ЦП циркулирующего в крови Ag-N180, позволил диссертанту прийти к заключению, что выявленная изоформа ЦП внепеченочного происхождения и по своим антигенным и лектин-связывающим свойствам не совсем идентична холо-ЦП. По мнению автора, функция этой изоформы связана с обеспечением потребности растущего организма в меди. Экспериментальная часть работы прекрасно иллюстрирована.

В главе «Заключение» представлен всесторонний и глубокий анализ исследования длительного поступления ионов серебра на метаболизм меди, которая является незаменимым микроэлементом в организме. Автором разработан физиологический метод введения серебра с пищей, что позволило на высоком методическом уровне провести хронический эксперимент. У животных с момента рождения и до 6 месяцев не было признаков токсикоза. Накопление серебра не приводит к дефициту меди в печени и мозге Ag-крыс. Изучение сравнительного действия серебра, поступающего с пищей в течение всей постнатальной жизни животных, позволило автору проанализировать его влияние на метаболизм меди на различных этапах онтогенетического развития. Автор приходит к заключению, что при длительном приеме серебра, начиная со дня рождения, у Ag-N180-крыс на фоне эмбрионального типа меди, индуцируется внепеченочный синтез и секреция ЦП, обеспечивающая потребность растущего организма в меди. Представлено четкое и хорошо аргументированное объяснение особенностей включения серебра в ЦП и блокирования функциональных центров по сравнению с купроэнзимами группы СОД, которые в этих условиях не инактивируются, так как серебро не может включаться в активный центр этих белков.



Таким образом, представленная диссертация является завершенной научно-исследовательской работой, с четкой трактовкой полученных экспериментальных данных, глубоким их анализом.

Вопросы и замечания по рецензируемой работе.

1. Ионы серебра добавляли в пищу здоровым животным, у которых не нарушен метаболизм меди. Как можно объяснить такую выраженную конкурирующую способность ионов серебра по отношению к меди, микроэлемента, необходимого для нормальной жизнедеятельности организма, четко выявленной автором на уровне транспортной системы меди и способности встраивания в ЦП.

2. Чем обусловлены такие выраженные изменения метаболизма меди, связанные с активностью генов, снижением оксидазной и ферроксидазной активности ЦП на фоне его повышения (стр.82) у 40-дневных крыс по сравнению с 5- и 20-дневными.

3. Ваше отношение относительно использования серебра в качестве биологически активной добавки при патологических состояниях.

Высказанные замечания носят сугубо дискуссионный характер и их следует рассматривать в качестве пожеланий для последующего развития исследований.

**Заключение.** Диссертационная работа Ильичевой Екатерины Юрьевны «Механизмы влияния ионов серебра на метаболизм меди млекопитающих» представляет собой самостоятельный научно-исследовательский труд, в котором рассматривается фундаментальная медико-биологическая проблема, посвященная изучению гомеодинамики меди у млекопитающих в условиях длительного поступления в организм катионов серебра, являющихся природными электронными близнецами ионов меди  $Cu(I)$ . Полученные ею результаты имеют большое научно-практическое значение, они расширяют наши представления об особенностях метаболизма меди при неблагоприятных экологических условиях. Особая значимость и ценность данной диссертации состоит в том, что автором выделена новая изоформа ЦП. Все это открывает новые горизонты и новые подходы в области изучения особенности обмена меди в норме и при патологии. Диссертация Екатерины Юрьевны Ильичевой

«Механизмы влияния ионов серебра на метаболизм меди млекопитающих», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия по актуальности темы, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, по разработке новых теоретических положений соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждение искомой ученой степени.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник

Отделения клинико-диагностических исследований

ФГБУ Санкт-Петербургского научно-исследовательского

психоневрологического института им. В.М. Бехтерева

доктор медицинских наук, профессор

(Е.Е.Дубинина)

г. Санкт-Петербург

192019, ул. Бехтерева, 3,

Психоневрологический институт им. В.М. Бехтерева

тел. 670-02-26,

eedubinina@rambler.ru



Е.Е. Дубининой

ЗАБЕРЯЮ

Е.Р. Назина

Маи

20.11.19