

**ОТЗЫВ**  
**официального оппонента на диссертационную работу**  
**ИЛЬЧЕВОЙ Екатерины Юрьевны**  
**«Механизмы влияния ионов серебра на метаболизм меди**  
**млекопитающих», представленную на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук, по специальности 03.01.04 – биохимия**

Одной из интенсивно развивающихся областей современной биохимии является изучение медьсодержащих ферментов и метаболических систем переноса меди, ответственных за перенос катионов меди (I) и контролирующих их окислительно-восстановительный статус. Катионы меди участвуют в регуляцию клеточного цикла, в формировании иммунного ответа, в контроле окислительно-восстановительных процессов, в том числе генерации свободных форм кислорода. Нарушение функциональной активности медьсодержащих ферментов и системы переноса меди приводит к развитию заболеваний нервной, сердечно-сосудистой, иммунной и других систем организма, а также провоцирует развитие онкологических заболеваний. Катионы меди (I) по своим физико-химическим свойствам близки катионам серебра (I), которые хотя и не являются компонентами живых клеток, но способны функционально заменять катионы меди (I). Это приводит к конкуренции между ними и катионами меди (I) и к нарушению зависимых от меди биохимических и физиологических процессов. Однако исследования влияния катионов серебра на различные аспекты метаболизма меди у млекопитающих остаются мало изученными. Широкое распространение катионов серебра (I), их токсичное воздействие на организм, с одной стороны, и ряд специфических биологических эффектов, с другой, делают проблему изучения молекулярных механизмов их действия на клетку одной из актуальных проблем экологической биохимии, энзимологии, токсикологии. Решению этой важной проблемы и посвящена диссертационная работа Ильичевой Е.Ю., основной целью которой является изучение гомеодинамики меди у крыс, длительное время употреблявших корм, содержащий ионы серебра.

Из цели исследования логично вытекают четыре основных задачи, которые заключались в следующем: (1) изучить влияние катионов серебра (I), в зависимости от начала и длительности Ag-диеты, на показатели статуса меди в сыворотке крови, в печени оценить активность генов метаболической системы меди, исследовать активность медьсодержащих ферментов печени и сыворотки крови, а также сравнить распределение катионов меди и серебра в тканях крыс и определить субклеточную локализацию катионов серебра в гепатоцитах; (2) провести сравнительный анализ влияния Ag-диеты на метаболизм меди у крыс, получавших катионы серебра в течение месяца

(группа Ag-A30), и животных, получавших катионы серебра в течение всей жизни (группа Ag-N180); (3) из сыворотки групп крыс Ag-A30 и Ag-N180 с помощью ионообменной хроматографии выделить частично очищенные препараты церулоплазмينا и сравнить их физико-химические свойства; (4) исследовать лектин-связывающие свойства и скорость секреции изоформ церулоплазмينا в группе крыс Ag-N180. Положения, выносимые на защиту, хорошо и четко сформулированы, и вносят достойный вклад в решаемую автором проблему.

Диссертация Ильичевой Е.Ю. написана по традиционному плану и содержит все необходимые разделы – введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, который включает 264 источника, в том числе 18 отечественных и 246 зарубежных публикаций. Диссертация изложена на 148 страницах, иллюстрирована 4 таблицами и 46 рисунками.

Во Введении обосновывается актуальность изучаемой проблемы, формулируются цель и задачи исследования и положения, выносимые на защиту, отмечены научная новизна полученных результатов, а также их теоретическое и практическое значение. Обзор литературы написан ясно и логично, хорошим языком. В нем проводится тщательный и всесторонний анализ биологической роли меди в организме млекопитающих, описаны структурно-функциональные свойства транспортирующих медь белков, детально проанализированы два типа метаболизма меди у млекопитающих. Приведен подробный анализ экспериментальных моделей на животных, предназначенных для изучения метаболизма меди. В последнем разделе обзора литературы (раздел 1.5) автор проводит сравнение катионов меди (I) и серебра (I) и показывает их значительное сходство, что и лежит в основе способности серебра заменять меди в зависимых от меди биохимических каскадах. В качестве замечания необходимо отметить, что в заключительной части обзора литературы желательным было акцентировать внимание на тех нерешенных проблемах и вопросах, которые требуют своего решения и составили суть предпринятого автором исследования.

Диссертационная работа Ильичевой Е.Ю. выполнена с применением современных биохимических и генетических методов и подходов. Среди них методы выделения препаратов белков и нуклеиновых кислот (выделение тотальной РНК, разделение клеточных органелл методом равновесного центрифугирования, выделение очищенного препарата церулоплазмينا, и др.), методы исследования нуклеиновых кислот и белков (обратная транскрипция, сопряжённая с полимеразной цепной реакцией, электрофоретическое разделение белков, иммуноблоттинг и

иммуноэлектрофорез, выявление оксидазной и ферроксидазной активности в сыворотке крови крыс и в гелях с помощью окрашивания специфичными красителями, определение активности супероксиддисмутазы в сыворотке крови крыс и в гелях, определение скорости секреции церулоплазмينا, меченого изотопом С-14), аналитические методы (измерение спектров УФ-поглощения и кругового дихроизма, измерение концентрации катионов металлов с помощью атомноадсорбционной спектроскопии), методы гистологического анализа, физиологические подходы (проведение физиологического теста «Условная реакция пассивного избегания», проведение теста «Открытое поле»).

Статистическая обработка результатов выполнена корректно, с применением дисперсионного анализа с последующим использованием *posthoc* критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для сравнения трех и более экспериментальных групп и *t*-критерия Стьюдента для сравнения двух групп. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные, не удовлетворяющие критериям нормального распределения и не прошедшие тест на равенство дисперсий, обрабатывали с применением теста Краскала-Уоллиса.

Глава с описанием результатов собственных исследований и их обсуждение в полной мере соответствуют задачам исследования. В процессе проведения исследований автор получил принципиально новые результаты, которые вносят достойный вклад в решаемую им проблему. Впервые получены доказательства существования альтернативного механизма, поддерживающего статус меди у лабораторных грызунов при длительном поступлении с пищей катионов серебра. Установлено, что эффекты Ag-диеты зависят от ее длительности и периода онтогенеза животных. Так получение катионов серебра только в период молочного вскармливания (первые 23 дня жизни) существенно не влияет на показатели статуса меди, и смену эмбрионального типа метаболизма меди на взрослый тип. Показано, что катионы серебра в этом случае переносятся по тем же межорганым и внутриклеточным транспортным путям, что и катионы меди. В то же время в сыворотке крови взрослых крыс, находящихся на Ag-диете в течение 30 суток (группа Ag-A30), концентрация катионов меди и ферроксидазная активность значительно снижены, в то время как содержание иммунореактивного церулоплазмينا и активность генов метаболической системы меди в печени не меняются. В сыворотке крови крыс группы Ag-N180, полгода находящихся на Ag-диете, концентрация меди и ферроксидазная активность снижаются в меньшей степени (в два раза), концентрация иммунореактивного церулоплазмينا существенно не меняется, а активность генов метаболической системы меди в печени заметно снижается. Впервые

установлено, что в группе Ag-N180 сохраняется способность к репродукции, но количество крыс в пометах существенно снижается в сравнении с контролем. Впервые показано, что в группе Ag-N180 циркулируют две изоформы церулоплазмينا, которые по пространственной структуре и ферментативной активности ближе к холо-церулоплазмину, чем к ферменту в группе Ag-A30, но при этом по аффинности к DEAE-Сефарозе, скорости секреции в кровотоки и составу входящих в их структуру углеводных цепей, они отличаются от холо-церулоплазмينا.

Диссертационная работа Ильичевой Е.Ю., несомненно, имеет большое значение не только для фундаментальной биохимии, но и для экологии и токсикологии. Полученные данные послужат основой для рассмотрения серебра как важнейшего экотоксикологического фактора и позволят выработать научно-обоснованные рекомендации по снижению влияния загрязнения окружающей среды катионами серебра на здоровье человека и животных. Наряду с этим, полученные результаты позволят приблизиться к пониманию ряда регуляторных эффектов катионов серебра (I) на физиологические и биохимические процессы в организме, которые могут быть полезны при ряде патологических состояний и, как можно полагать, связаны с модуляцией зависимых от меди функциональных систем клетки. О практической значимости работы свидетельствует тот факт, что она была поддержана большим числом грантов РФФИ (09-04-01165-а, 09-04-01406-а, 11-04-09445-моб\_з, 12-04-09566-моб\_з, 12-04-31518 мол\_а). Результаты исследования могут быть использованы для разработки лекционных курсов по биохимии, физиологии, экологической химии и токсикологии для студентов биологических, химических и медицинских факультетов Санкт-Петербургского и Московского государственных университетов и других вузов.

Выводы представлены корректно и грамотно сформулированы, полностью отражают полученные автором экспериментальные результаты и сделанные на их основе теоретические заключения.

По материалам диссертации имеется 20 печатных работ, в том числе четыре статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций. Промежуточные этапы исследования, основные положения и результаты работы широко обсуждались автором на различных отечественных и иностранных конференциях и симпозиумах.

Автореферат диссертационной работы Курбатовой И.В. в полной мере отражает основные результаты и выдвигаемые на их основе положения и соответствует требованиям ВАК РФ.

В целом диссертационная работа Ильичевой Екатерины Юрьевны, несомненно, заслуживает положительной оценки. Принципиальных замечаний и возражений она не вызывает. По работе имеются ряд вопросов, которые не влияют на общую положительную оценку работы, но требуют разъяснения.

#### Вопросы и замечания

1. Насколько корректно в одной шкале координат анализировать и сравнивать группы постнатальных крыс, которые получали соединения серебра с молоком самок, находящихся на Ag-диете, и взрослых животных, которые сами получали такую диету. Возможно, с этим связаны столь разительные различия в группах Ag-N40 и Ag-A30, сопоставимых по поступлению катионов серебра?
2. Авторы указывают на то, что у Ag-N180 крыс репродуктивная функция проявляется в том же возрасте, что и в контроле (на 60-70-е дни жизни). Они производят жизнеспособное потомство, однако число особей в помете в 2-3 раза ниже, чем в контроле (страница 73). Однако далее они пишут, что, согласно ранее полученным данным, содержание самок на Ag-диете в течение всего срока беременности приводит к развитию аномалий у эмбрионов, пренатальной смерти или к 100% смерти новорожденных животных в первые сутки жизни. Как согласуются эти результаты?
3. В тексте на странице 78 указано «При этом существенных различий в концентрации меди в этих органах у контрольных и Ag-N крыс нет». Однако, это не очень согласуется с данными, представленными на рисунке 3.19, А (5 суток). С чем связано значительное (примерно в 2.5 раза) повышение содержания меди в печени 5-сут крысят, которых кормили самки, находящиеся на Ag-диете? При этом содержание серебра в печени этих животных сопоставимо с таковым у 20- и 40-сут Ag-N-крыс?
4. Какой компонент в пике IV может обладать супероксиддисмутазной активностью, если молекулярная масса веществ, выходящих в этом пике составляет менее 10 кДа (страница 95)? В то же время самая маленькая цитозольная супероксиддисмутаза имеет молекулярный вес 32 кДа, а другие формы фермента намного тяжелее.
5. Не понятно, почему на разных сроках применения Ag-диеты столь существенно (более чем на порядок) меняется содержание атомов серебра в молекуле церулоплазмينا. Объяснение, приведенное на странице 97 («Избыток» атомов серебра в молекуле ЦП можно объяснить тем, что вначале диеты абсорбция серебра в ЖКТ, как и экспрессия Cu(I)-шаперонов в печени, не регулируются, и в молекулу ЦП встраиваются атомы серебра не только в

активные центры, но и в доступные остатки цистеина, которых в молекуле ЦП 14»), не представляется убедительным.

Незначительные замечания:

1. Термин «Свободная медь» на странице 11 не корректен, поскольку речь идет о катионах меди, которые, ко всему прочему, всегда находятся в комплексе с различными молекулами и функциональными группами биополимеров.
2. Фразы «Хочу оставить» и «Учтено» на страницах 16 и 26 возникли, вероятно, на стадии написания.
3. На странице 26 между цистеинами и катионом меди, а не серой? Там же – как катион меди может координироваться с четырьмя атомами азота имидазольного кольца, если их всего два – вероятно, речь идет о двух остатках гистидина?
4. «Металлсвязывающий» - пишется с двумя «л» (страницы 40-41).
5. Термин «пищевые ионы серебра» не удачен (страница 62).
6. Название раздела 3.1 не удачно – изучается не влияние хлорида серебра на метаболизм меди, а влияние Ag-диеты. То же в отношении раздела 3.3.
7. В подписи к рисунку 3.10 вместо «Г» указано «Д».
8. Ошибка и неудачное построение фразы на странице 97 («не приципитируется. Возможно, из-за потому, что практически...»).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

**Диссертационная работа Ильичевой Екатерины Юрьевны «Механизмы влияния ионов серебра на метаболизм меди млекопитающих» представляет собой самостоятельный научно-исследовательский труд, который посвящен актуальной проблеме современной биохимии и экологической химии – влиянию длительного поступления в организм катионов серебра на функциональную активность метаболической системы меди и медьсодержащих ферментов. Автор впервые получил доказательства существования альтернативного механизма, поддерживающего статус меди у крыс при длительном поступлении с пищей катионов серебра и показал, что эффекты Ag-диеты зависят от ее длительности и периода онтогенеза животных. Впервые установлено, что в сыворотке крови взрослых крыс, находящихся на Ag-диете в течение 30 суток, концентрация катионов меди и ферроксидазная активность снижены в большей степени, чем у животных, получавших катионы серебра в течение 180 суток. В то же время активность генов метаболической системы меди в печени менялась только у крыс, получавших катионы серебра в течение 180**



суток. Впервые показано, что длительное потребление катионов серебра приводит к изменению структуры церулоплазмينا, который по пространственной структуре и ферментативной активности хотя и близок к холо-церулоплазмину, но отличается от него по аффинности, скорости секреции и составу входящих в его структуру углеводных цепей. Все вышесказанное позволяет заключить, что по своей актуальности, новизне поставленных и решенных задач, научному и практическому значению диссертационная работа Ильичевой Екатерины Юрьевны «Механизмы влияния ионов серебра на метаболизм меди млекопитающих», полностью соответствует требованиям, предъявляемые к кандидатским диссертациям в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденном постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункт 9-14), а автор исследования достоин искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
доктор биологических наук

А.О. Шпаков

«16» мая 2014 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии  
им. И.М. Сеченова Российской академии наук,  
пр. Тореза 44, 194223, Санкт-Петербург  
(812)552-31-17  
Электронная почта: alex\_shpakov@list.ru

