

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе

Санкт-Петербургского государственного
университета

С.П.Туник

«2» мая 2014 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию 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

Изучение биологической роли микроэлементов в организме человека и животных давно привлекает внимание специалистов – биологов и медиков. Особый интерес в этом отношении представляет медь. К настоящему времени накоплены многочисленные данные о том, что этот жизненно важный микроэлемент является ко-фактором или входит в структуру активного центра ряда ферментов: цитохром-с-оксидзы, фенолазы, $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -супероксиддисмутазы, медьсодержащих феррооксидаз, участвующих в переносе ионов железа и многих других ферментов. Кроме того среди функций меди необходимо упомянуть участие её в одном из этапов формирования иммунного ответа, в регуляции клеточного цикла за счет индукции апоптоза, в развитии мозга и т.д. Установлено, что избыточное поступление в организм меди или её недостаток, а также наследуемые нарушения метаболизма или транспорта этого микроэлемента лежат в основе патогенеза нейродегенеративных и онкологических заболеваний, нарушения работы сердечно-сосудистой системы и др.

В последнее десятилетие в литературе начали появляться сведения о возможном влиянии ионов серебра на транспорт и биологические свойства меди. Сходство в строении наружной электронной оболочки Cu(I) и Ag(I) и их координационных свойствах делает возможным участие медь-транспортующей системы белков в переносе ионов серебра. Более того, конкурируя с медью за транспортные белки или встраиваясь в активные центры купро-энзимов, серебро может снижать биодоступность меди и изменять свойства зависящих от меди ферментов. Однако, подобные сведения малочисленны и довольно противоречивы. Все это подтверждает несомненную актуальность и важность темы предпринятой Е.Ю.Ильчевой диссертационной работы,

посвященной изучению механизмов влияния ионов серебра на метаболизм меди в тканях млекопитающих.

Диссертационная работа Е.Ю.Ильичевой изложена на 148 страницах; она построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования и материалов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, состоящего из 264 отечественных и зарубежных источников. Работа содержит 4 таблицы и иллюстрирована 46 рисунками.

Во «Введении» автор, кратко охарактеризовав проблему, четко сформулировала цели и задачи своего исследования. Раздел «Обзор литературы», написанный хорошим литературным языком, содержит информацию о биологической роли меди в организме человека и животных; достаточно детально охарактеризованы белки, транспортирующие ионы меди. Особое внимание уделено обсуждению двух типов метаболизма меди и особенностям системы транспорта этого микроэлемента на разных этапах онтогенеза. В обзоре литературы рассмотрены также различные экспериментальные модели, позволяющие изучить метаболизм меди у животных. Кроме того приведены краткие сведения о физико-химических свойствах Cu(I) и Ag(I) . При этом автор подчеркнула, что, несмотря на то, что серебро может связываться со всеми известными медь-транспортирующими белками и переноситься ими, ионы серебра неспособны выполнять биологические функции меди, поскольку не меняют свою степень окисления.

Надо отметить, что при составлении обзора литературы диссертант использовала и критически проанализировала не только работы, ставшие классическими, но и множество публикаций самых последних лет. Единственным недочетом данного раздела диссертации является то, что в подписях к рисункам 1.1 – 1.4 отсутствуют ссылки на публикации, откуда взяты эти схемы.

При выполнении диссертационной работы Е.Ю.Ильичева использовала современные биохимические и молекулярно-биологические методы, которые подробно описаны ею в разделе «Материалы и методы». Среди них: различные виды спектрофотометрии, гель-электрофорез, иммуноэлектрофорез, ионообменная хроматография, ПЦР, определения скорости включения радиоактивной метки ^{14}C в препараты церулоплазмينا и многие другие. Кроме того для оценки психоэмоционального состояния животных, в течение длительного времени (180 дней) получавших серебро с пищей, диссертант дополнительно использовала ряд

физиологических тестов. Все примененные методические подходы адекватны поставленным задачам данного исследования.

Основными результатами, определяющими новизну и теоретическую значимость диссертационной работы Е.Ю.Ильичевой, на наш взгляд являются следующие.

1. Диссертант впервые изучила влияние ионов серебра на метаболизм меди в тканях крыс в ходе онтогенеза. Установлено, что серебро, поступающее в организм животных во время молочного вскармливания, т.е. на начальных этапах постнатального периода (первые 23 дня жизни крыс) транспортируется теми же системами, как и медь, но при этом не оказывает влияния на показатели статуса меди. Более того, в этом случае присутствие ионов серебра не сказывается на смене эмбрионального типа метаболизма меди на взрослый тип.

2. Е.Ю.Ильичева впервые обнаружила, что 30-дневное содержание взрослых крыс на Ag-диете (в отличие от растущих животных) приводит к избирательному накоплению серебра в митохондриях печени, далее они транспортируются в цистерны мембран аппарата Гольджи, где встраиваются в молекулы церулоплазмينا. Относительное содержание зрелых транскриптов генов компонентов метаболической системы меди (медь-связывающие и медь-транспортирующие белки) при этом не менялось. В то же время в сыворотке крови этих животных была резко снижена концентрация меди и практически пропадали (ферр)оксидазная активность.

3. Интересные и приоритетные данные получены Е.Ю.Ильичевой при исследовании длительного (в течение 6 месяцев) влияния Ag-диеты на метаболизм меди. Показано, что уже к 40-му дню в сыворотке крови уменьшается в среднем в 2 раза как концентрация меди, так и (ферр)оксидазная активность. Анализ распределения серебра в различных органах показал, что максимальные количества этого иона накапливаются в печени, в меньшей степени – в селезенке, почках и легких; минимальные уровень серебра был найден в головном мозге. Установлено относительно равномерное накопление ионов серебра в субклеточных органеллах печени. Однако, при сравнении с данными, полученными на крысах Ag-A30, диссертант установила преимущественное накопление серебра у крыс Ag-N180 в цитозоле (до 40% общего содержания Ag), в то время как у крыс Ag-A30 содержание Ag в этом компартменте было менее 5%. По данным Е.Ю.Ильичевой белками, с которыми связываются ионы серебра в цитозоле печени Ag-N180 крыс, являются церулоплазмин (наличие его связано с присутствием в печени крови), металлотионеин (содержит ионы серебра и меди), а также неизвестный компонент, проявляющий СОД-подобную активность.

4. Впервые изучив экспрессию генов, ассоциированных с метаболизмом меди в печени крыс, содержащихся в течение 180 дней на Ag-диете, диссертант продемонстрировала снижение количества мРНК, программирующих синтез белков, участвующих в транспорте меди (CNR1, CNR2, MT1a, COMMD1, COX4i1, CCS). В то же время уровень экспрессии других исследованных генов, связанных с метаболизмом меди, (в частности, СОД1) достоверно не изменялся. Это согласуется с результатами иммуноблотига по выявлению соответствующих иммунореактивных белков: уровень активности СОД1 в цитозоле печени опытных и контрольных животных был одинаковым.

5. Значимыми и принципиально новыми являются полученные Е.Ю.Ильичевой данные по анализу частично очищенных препаратов церулоплазмينا. Установлено, что фракции церулоплазмينا (ЦП) сыворотки крови крыс двух групп Ag-A30 и Ag-N180 содержат молекулы ЦП разной конформации. Автор вполне обосновано предположила, что препарат ЦП крыс Ag-N180 содержит большее количество молекул с правильно сформированным сайтом связывания меди типа I. Кроме того, диссертант установила, что в сыворотке крови крыс, находившихся на Ag-диете в течение 180 дней, присутствует несколько изоформ ЦП, в частности, асиалированные формы.

6. В экспериментах с использованием ^{14}C Е.Ю.Ильичевой впервые удалось доказать, что в крови крыс Ag-N180 циркулируют формы ЦП, различающиеся не только по антигенным и лектин-связывающим свойствам, но и имеющий разное происхождение (печеночного и не печеночного).

7. Анализ аминокислотных остатков, участвующих координации меди в активных центрах церулоплазмينا, СОД1 и СОД3, позволил диссертанту сделать заключение о том, что в активных центрах обеих СОД атомы меди координируются только остатками гистидина, которые являются донорами электронов промежуточной жесткости и хорошими лигандами для Cu(II) , в то время как стабилизация ионов серебра Ag(I) , представляющего собой мягкий акцептор, менее выгодна. Таким образом, ионы серебра не могут быть включены в молекулы СОД и, следовательно, эти ферменты не инактивируются в присутствии серебра. Напротив, цистеинсодержащие центры ЦП могут «принять» ионы серебра, но они не могут окисляться, что приводит к потере ферментативной активности ЦП.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Е.Ю.Ильичевой нет. В порядке дискуссии хотелось бы получить ответы автора на следующие вопросы:

- 1) На основании анализа влияния введения серебра на метаболизм меди у животных группы Ag-A30 высказано предположение, что медь, введенная этим животным, поступает в комплекс Гольджи, где встраивается в апо-ЦП и, возможно, в Ag-ЦП.

Как полагает диссертант: присоединяется ли медь к уже существующим молекулам Ag-ЦП, вытесняя ионы серебра, или ионы меди присоединяются к другому сайту?

- 2) Что является «триггером» для перехода от эмбрионального типа метаболизма меди к взрослому типу; когда это происходит и какова длительность этого процесса перехода?
- 3) Чем можно объяснить достаточно высокую концентрацию ионов серебра в селезёнке крыс группы Ag-N180 (выше, чем в печени и других исследованных тканях) – рис.3.25 (стр.85) ?
- 4) В цитозоле печени крыс группы Ag-N180 диссертант обнаружила, что ионы серебра связываются с металлотioneином и другим неизвестным низкомолекулярным компонентом, проявляющим СОД-активность (стр.95). Есть ли у автора какие-либо предположения о возможной природе таких компонентов?

Завершая анализ диссертации Е.Ю.Ильичевой, можно сказать, что полученные автором приоритетные данные вносят значительный вклад в существующие представления о механизмах транспорта меди, распределении её в тканях и субклеточных компартментах и о молекулярных механизмах формирования активных центров церулоплазмينا.

Результаты, демонстрирующие влияние ионов серебра, поступающего в организм животных с пищей, на гомеостаз меди, имеют определенную практическую ценность: они могут служить основой для разработки научно-обоснованных рекомендаций по снижению эффекта загрязнения окружающей среды серебром, в частности при использовании солей серебра в качестве обеззараживающих средств.

Диссертация тщательно оформлена. Содержащиеся в диссертационной работе выводы и заключения базируются на обширном экспериментальном материале, полностью обоснованы и экспериментально доказаны. Автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации. Основные положения работы Е.Ю.Ильичевой достаточно полно отражены в 4 печатных работах в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах; они неоднократно обсуждались на представительных международных и российских конференциях и симпозиумах.

Результаты, полученные Е.Ю.Ильичевой, могут быть использованы в исследованиях, проводимых в ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова» РАН, в Северо-Западном государственном медицинском университете

им.И.И.Мечникова МЗ РФ, в ФГБОУ ВПО «Медицинский университет им.И.П.Павлова» и других учреждениях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

по актуальности темы, объему и новизне экспериментального материала, обоснованности выводов и заключений, их теоретической и практической значимости диссертация ИЛЬИЧЕВОЙ Екатерины Юрьевны «Механизмы влияния ионов серебра на метаболизм меди млекопитающих» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней»), а её автор Екатерина Юрьевна Ильичева заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

20 мая 2014 г.

Отзыв составлен доктором биологических наук профессором кафедры биохимии Ещенко Н.Д.

Отзыв заслушан и обсужден на заседании кафедры биохимии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета (протокол № 14 от 29 апреля 2014 г.)

Заведующий кафедрой биохимии:

В.Е.Стефанов

