

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ивановой Анны Владимировны «Состояние окислительного фосфорилирования и антиоксидантного статуса митохондрий ткани головного мозга крыс при гипогликемической коме и различных способах ее купирования», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности - 03.01.04 – биохимия

Диссертационное исследование посвящено сравнительному изучению процессов дыхания, окислительного фосфорилирования и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в митохондриях, изолированных из головного мозга контрольных крыс, этих животных в состоянии инсулин-индуцированной гипогликемической комы и крыс после ее купирования введением глюкозы или глутамата натрия в сочетании с вдыханием гиперкапнической газовой смеси. В работе изучались также антиоксидантные эффекты митохондрий мозга крыс, выделенных из мозга контрольных и подопытных животных, а также уровень продуктов ПОЛ в сыворотке крови этих животных.

Актуальность темы выполненной работы. Исследование инсулинового сигналинга, способности инсулина нормализовать метаболизм и функциональную активность нейронов, с одной стороны, и способности инсулина при введении в высоких дозах быть причиной нарушения жизнеспособности нейронов, с другой стороны, важны для создания новых лечебных препаратов, способных противостоять развитию поражения нейронов головного мозга при многих распространенных болезнях. Нарушение функций нейронов головного мозга и различные виды нейропатий могут возникать при дефиците инсулина, что имеет место при диабете 1-го типа. Нарушения функций мозга у больных людей и животных могут возникнуть и при развитии резистентности нейронов к действию инсулина, что имеет место при диабете 2 типа и болезни Альцгеймера, имеющих много общих черт поражения мозга, что привело к тому, что болезнь Альцгеймера называют диабетом 3 типа. По-видимому, инсулин имеет хорошие перспективы для применения в качестве лекарства для лечения болезни Альцгеймера, что повышает интерес к пониманию механизма нарушения метаболизма и функций нейронов при его передозировке. Нарушение инсулинового сигналинга в нервных клетках происходит, по-видимому, и при ишемии и реперфузии мозга. Очень опасны и гипогликемические воздействия на организм, которые часто имеют место при лечении введением инсулина больных диабетом. Их регулярное воздействие на организм может вызывать даже большее нарушение функций мозга в связи с неблагоприятным воздействием гипогликемических состояний на нервные клетки, чем недостаток этого гормона. Однако как механизм защитного действия инсулина на нейроны, так и механизм поражения нервных клеток при введении больших доз инсулина с лечебной целью пока

далеки от понимания, не выяснено как влияют недостаток и избыток инсулина на метаболизм и функции митохондрий нервных клеток. Митохондрии играют ключевую роль в процессах генерации активных форм кислорода, апоптотической и некротической гибели клеток, в регуляции внутриклеточных концентраций ионов кальция. С другой стороны, для этих клеточных органелл характерно наличие многих ферментов антиоксидантной защиты. В работе А.В.Ивановой проведено систематическое исследование влияние избытка инсулина, приводящего к гипогликемической коме, и двух способов ее купирования на дыхание, окислительное фосфорилирование и процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в митохондриях, выделенных из мозга крыс. Все это определяет несомненную актуальность проведенного А.В.Ивановой исследования.

Цель исследования сформулирована четко и понятно, целью работы является проведение сравнительного анализа изменений в работе дыхательных цепей митохондрий и их оксидантного статуса при инсулин-индуцированной гипогликемической коме и в различные сроки восстановительного периода после купирования глюкозой и глутаматом натрия в сочетании с вдыханием гиперкапнической газовой смеси. В соответствии с объявленной целью сформулировано 4 задачи исследования, охватывающие изучение процессов дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из ткани мозга здоровых крыс (контроль), крыс в состоянии гипогликемической комы на высоте судорожного припадка, а также этих животных на двух разных сроках после купирования судорог глюкозой или глутаматом натрия в сочетании с вдыханием воздуха, содержащего 7 % CO₂. В задачи исследования входило также изучение процессов ПОЛ в мембранах митохондрий, выделенных из мозга, и в сыворотке крови всех вышеперечисленных групп животных.

Научная новизна исследования. Такие работы в литературе отсутствовали, хотя общепризнана зависимость жизнеспособности и функционального состояния нейронов от процессов, протекающих в митохондриях. В работе А.В.Ивановой впервые изучены скорости дыхания и процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях, выделенных из мозга крыс, находящихся на пике развития гипогликемической комы и на разных сроках после ее купирования глюкозой или глутаматом натрия с одновременным вдыханием гиперкапнической газовой смеси. Новизну работы определяет и изучение автором антиоксидантного эффекта митохондрий и интенсивности ПОЛ в этих органеллах выделенных из мозга контрольных и подопытных животных. Такого рода систематическое исследование также проведено впервые.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в диссертационной работе данные углубляют представления о вкладе митохондрий в

нарушения метаболизма и функций нейронов на разных этапах развития метаболических нарушений в ткани мозга при инсулин-индуцированной коме и ее купировании глюкозой или глутаматом натрия с одновременным вдыханием гиперкапнической газовой смеси. Перспективность купирования гипогликемических судорог глутаматом натрия, который при введении животным *in vivo* обладает эксайтотоксическим воздействием на клетки мозга, вызывает *a priori* большие сомнения. Но сравнение эффектов глюкозы и глутамата натрия, использованных для купирования судорог, на метаболические процессы в митохондриях, выделенных из мозга подопытных животных, представляет несомненный интерес. Подобного рода исследования важны для выработки новых подходов к коррекции наблюдаемых нарушений при инсулин-индуцированной гипогликемической коме, а также, возможно, для разработки мер профилактики этих нарушений.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации. Работа содержит большой экспериментальный материал, полученный современными и адекватными биохимическими методами. На основании полученных данных сделано 5 обоснованных выводов. Основные выводы работы и выносимые на защиту положения полностью соответствуют полученным результатам. Все данные грамотно статистически обработаны. Детальное знакомство с рукописью позволяет говорить о высокой степени обоснованности и достоверности представленных в диссертации материалов.

Методический уровень. Работа выполнена на хорошем методическом уровне. Автор показала, что хорошо владеет современными методами определения скорости дыхания и параметров окислительного фосфорилирования митохондрий. У подопытных и контрольных животных были определены скорости дыхания выделенных из мозга митохондрий, находящихся в различных метаболических состояниях - V_2 , V_3 (в присутствии АДФ) и V_4 (после исчерпания ресурса АДФ и его превращения в АТФ), определяли также скорость дыхания митохондрий в присутствии разбавителя 2,4-динитрофенола. Это позволило вычислить значения дыхательного контроля по Чансу и Ларди. Определяли также отношение P/O и скорость фосфорилирования добавленной АДФ. В качестве субстратов использовали глутамат и сукцинат. Проведение таких исследований является нелегкой задачей, особенно, когда речь идет о митохондриях, выделенных из мозга. Диссертантка отлично справилась с ней, о чем, в частности говорит возвращение скорости дыхания митохондрий после исчерпания АДФ к исходному уровню ($V_2=V_4$) и определенные ею отношения P/O для глутамата и сукцината, близкие к теоретическим (3 и 2, соответственно).

Достоинством работы является и тот факт, что для оценки интенсивности процессов ПОЛ в изолированных из мозга крыс митохондриях было определено содержания разных продуктов ПОЛ (гидроперекисей, диеновых конъюгатов, ТБК-реактивных продуктов), а

также уровень восстановленного глутатиона. Хотя ссылки на методы, использованные для определения содержания продуктов ПОЛ в митохондриях относятся к давним годам, но это «классика», эти методические приемы по сути мало изменились с тех пор.

Оценивая использованные методы исследования, следует признать, что они полностью соответствует целям и задачам работы, а методический уровень исследования достаточно высок для кандидатской диссертации по биологическим наукам.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 126 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания примененных методов исследования, экспериментальных животных и условий опытов (глава 2), описания результатов проведенных автором исследований и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 216 источников, большая часть которых опубликована за рубежом. Иллюстративный материал включает 2 рисунка и 13 таблиц.

Обзор литературы занимает 32 страницы машинописного текста. В нем изложены современные представления об особенностях метаболизма головного мозга, в частности, его энергетического обмена при тяжелых гипогликемических состояниях и на разных сроках после их купирования, обсуждается вопрос о том, какие метаболические нарушения приводят к развитию судорожных состояний при гипогликемии. Обзор написан четко и ясно. В нем приведены как работы последних лет, так и исходные работы. Возможно, автор несколько увлеклась изложением истории вопроса, что привело к обилию ссылок на ранние работы. Но обзор отражает современные представления об особенностях метаболических процессов, протекающих в ткани мозга, в том числе энергетического обмена и процессов ПОЛ, при тяжелых гипогликемических состояниях и после их купирования.

В разделе «Экспериментальные животные, условия опытов и методы исследования», изложенном на 16 страницах текста, описаны использованные методы исследования. В нем приведены сведения об экспериментальных животных, о дозах и времени введения им инсулина и других веществ, описана клиника развивающегося инсулинового шока, вызванного введением инсулина. Автор достаточно подробно описывает методы выделения митохондрий из ткани мозга, определения скорости дыхания митохондрий, находящихся в разных метаболических состояниях, скорости фосфорилирования добавленной АДФ, определения отношения Р/О и содержания белка в пробах. Несколько разделов этой главы посвящены описанию использованных методов определения содержания гидроперекисей липидов, диеновых конъюгатов и ТБК-реактивных продуктов, восстановленного глутатиона и определения общей антиоксидантной активности изолированных из мозга митохондрий.

Глава 3, посвященная описанию полученных в ходе выполнения работы результатов и их обсуждению, занимает 32 машинописных страницы. Автор последовательно и понятно излагает полученные результаты, привлекая для обсуждения данные мировой литературы. В диссертации полученные данные приведены преимущественно в таблицах.

Заключение завершает диссертационную работу, в ней подводятся итог проделанной работы. Далее следуют выводы и список литературы, которая была процитирована при изложении проведенного исследования.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки и написана хорошим научным языком. Построение работы является традиционным.

Освещение диссертации в научной печати. Результаты диссертационного исследования были неоднократно доложены и обсуждались на международных и российских конференциях, симпозиумах и съездах. Материалы диссертации полностью опубликованы в открытой печати, что сделало их хорошо известными научной общественности. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе две статьи опубликованы в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК.

Автореферат полностью соответствует материалам, представленным в диссертационной работе. В нем отражены основные экспериментальные данные проведенного исследования, обоснована его актуальность, новизна, научная и практическая значимость, приведены выводы.

При ознакомлении с диссертацией возникло несколько вопросов, которые представляется правильным **вынести на обсуждение.**

1. Глутамат и другие возбуждающие аминокислоты при действии в высоких концентрациях на нейроны, имеющие глутаматные рецепторы, вызывают их гибель. Это явление называют эксайтотоксичностью. В работе купирование инсулин-индуцированных гипогликемических судорог у крыс осуществлялось не только введением глюкозы, но и глутамата натрия. Но глутамат натрия при его введении животным *in vivo* может вызывать гибель нейронов, имеющих глутаматные рецепторы. Можно ли, по мнению автора, подобрать такие концентрации глутамата, чтобы при его введении крысам он достигал бы нейронов, проникал в них и служил субстратом окисления в митохондриях, но при этом не проявлял бы токсичности при взаимодействии с глутаматными рецепторами на нейронах?

2. В работе отмечается, что при купировании судорог у крыс глутаматом натрия через 1 час после его введения наблюдается значительно более выраженное, чем при купировании судорог глюкозой, увеличение содержания таких продуктов ПОЛ как гидроперекиси, триеновые конъюгаты и кетотриены в изолированных из мозга митохондриях. Чем можно объяснить такое различие в эффектах глюкозы и глутамата натрия при купировании

гипогликемических комы и судорог, можно ли их приписать токсическому действию глутамата на нейроны, имеющие глутаматные рецепторы?

3. В работе повышение чувствительности дыхательных цепей митохондрий к разобщающему агенту 2, 4 – динитрофенолу (увеличение скорости разобщенного дыхания) через 24 часа после купирования судорог рассматривается как одно из свидетельств «постепенно наступающих неблагоприятных изменений в митохондриальных мембранах». Но, напротив, при действии прооксидантов на митохондрии (неблагоприятное воздействие) скорость их дыхания в присутствии разобщителя снижается (а не повышается), а антиоксиданты предотвращают это снижение (см., например, Takeyama et al., 1993, Makazan et al., 2007), что может объясняться повреждением прооксидантами ферментов дыхательной цепи. Поэтому неясно, почему уменьшение чувствительности митохондрий к разобщителю может быть признаком наступающих неблагоприятных изменений в их мембранах.

Заключение. Диссертационная работа Ивановой Анны Владимировны на тему «Состояние окислительного фосфорилирования и антиоксидантного статуса митохондрий ткани головного мозга крыс при гипогликемической коме и различных способах ее купирования» содержит решение важной научной задачи – установление характера изменений процессов дыхания, окислительного фосфорилирования и ПОЛ в митохондриях клеток мозга при инсулин-индуцированной гипогликемической коме и в различные сроки восстановительного периода после ее купирования.



Принимая во внимание актуальность выполненной работы, которая является законченным и перспективным исследованием, обоснованность и научную новизну сделанных обобщений и выводов, их теоретическую и практическую значимость, можно заключить, что диссертация А.В.Ивановой соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрхимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук
доктор биологических наук профессор


Аврова Наталия Федоровна

194223, г. Санкт-Петербург, пр. Гореза, д. 44.
Тел. (812) 5523024. E-mail: avrova@icphb.ru



Получены руки
верю
целярией
ального государственного бюджетного
дения науки Института эволюционной
ологии и биохимии им. И.М. Сеченова
оссийской академии наук


09.02.2016