

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОПОНЕНТА

на диссертационную работу Войновой Ирины Витальевны на тему «Особенности параметров метаболизма железа при хронической гипергликемии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

### Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Ирины Витальевны Войновой посвящена всестороннему анализу биохимических показателей обмена железа при хронической гипергликемии. Частота нарушений обмена железа в последние десятилетия неуклонно растет, и эти нарушения, как показали недавние исследования, тесно взаимосвязаны с осложнениями и отставленными последствиями коронавирусной инфекции, и наиболее остро выражены у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) и метаболическим синдромом. При этом выраженность нарушений обмена железа положительно коррелирует с выраженностью окислительного стресса, воспаления и гипоксии, в том числе со степенью снижения сатурации крови кислородом. Около двадцати лет назад был открыт гепцидин – гормон, регулирующий всасывание и депонирование ионов железа при перегрузке железом и в условиях воспаления. Показано также, что экспрессия генов, кодирующих белки, ответственные за запасание железа, в том числе церулоплазмин, также активируется при действии гипоксии и провоспалительных цитокинов. Не вполне ясно почему при наследственном дефиците церулоплазмينا и ряда других участников метаболизма железа повышается частота развития СД2. Одной из причин этого может быть то, что гипергликемия и продукты неферментативного окисления глюкозы вызывают модификацию аминокрупп белков, в том числе компонентов системы метаболизма железа, что негативно влияет на их функциональную активность и обуславливает взаимосвязь между диабетической патологией и нарушениями регуляции обмена железа, а также ассоциированными с ними анемией и нейродегенеративными заболеваниями.

Проблема взаимосвязи между нарушениями углеводного обмена, в том числе при сахарном диабете, и железodefицитными состояниями является одной из актуальных проблем фундаментальной биохимии, экспериментальной клинической медицины. Решению именно этой проблемы и посвящена диссертационная работа И.В. Войновой. Отдельно стоит подчеркнуть, что помимо исследования взаимосвязи между метаболическими нарушениями и степенью гипергликемии у пациентов с СД2 и функциональным состоянием у них компонентов системы метаболизма железа, И.В. Войнова исследовала в экспериментах *in vitro* снижение ферроксидазной активности

церулоплазмина вследствие его гликирования в условиях длительной гипергликемии, а также подтвердила эффективность коррекции сниженной активности церулоплазмина с помощью введения экспериментальным животным с гипергликемией лактоферрина, являющегося физиологическим лигандом и активатором церулоплазмина, что имеет исключительно важное значение для коррекции железодефицитных состояниях при диабетической патологии.

### **Общая характеристика диссертационного исследования**

Диссертация изложена на 192 страницах, построена по традиционному плану, содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы» и «Приложение». Раздел «Список литературы» содержит 485 ссылок на работы, среди которых 8 отечественных, а остальные – зарубежные, преимущественно это публикации последних 20 лет. Результаты работы проиллюстрированы 19 рисунками и 10 таблицами. Наличие обобщающей таблицы (стр. 89, таблица 1), суммирующей изменения параметров обмена железа при гипергликемии у пациентов с СД2, а также обобщающей таблицы по метаболическим индикаторам и показателям обмена железа (стр. 116, таблица 7) у крыс с экспериментальным диабетом, существенно облегчает анализ результатов, выполненных автором.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В разделе «Введение» довольно емко обоснована актуальность исследования особенностей показателей обмена железа и обозначена недостаточность представлений о молекулярных механизмах развития нарушений обмена при хронической гипергликемии. Далее последовательно сформулированы цель и задачи исследования; его научная новизна; теоретическая и практическая значимость; методология и методы исследования; основные положения, выносимые на защиту; степень достоверности и апробация результатов; личный вклад соискателя; сведения об объеме и структуре диссертационной работы. Используемые формулировки позволяют получить полное представление о сути диссертационного исследования и адекватно оценить его по объему выполненной экспериментальной и аналитической работы и по методическим подходам, использованным для решения поставленных задач, включающих анализ биохимических показателей в репрезентативной выборке образцов крови пациентов, оценку эффектов модификации глюкозой на активность белков, участников системы обмена железа *in vitro*,

подтверждение нарушений обмена железа при моделировании гипергликемии в условиях *in vivo*.

Глава «Обзор литературы» дает полное представление о молекулярных механизмах транспорта, запасания и реутилизации железа у человека и других позвоночных животных, о регуляции обмена железа на транскрипционном уровне и на уровне трансляции, о белок-белковых взаимодействиях белков, участников обмена железа, и связи последнего с обменом меди, а также о патогенезе инсулиннезависимого сахарного диабета. В целом раздел «Обзор литературы» производит хорошее впечатление, дополнен достаточно большим количеством схем и рисунков, облегчающих восприятие материала.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны принципы формирования групп при разделении пациентов и доноров, с целью дальнейшего анализа полученных от них образцов крови; методы определения параметров обмена железа, меди, холестерина и глюкозы, а также активности антиоксидантных ферментов и содержания гликированного гемоглобина; получение препаратов церулоплазмينا, трансферрина и ферритина, а также поликлональных антител против очищенных белков; гликирование белков *in vitro*; определение кинетических параметров взаимодействия белков с помощью биосенсоров на эффекте поверхностного плазмонного резонанса; моделирование экспериментальной гипергликемии у крыс и схемы введения рекомбинантного лактоферрина с целью коррекции осложнений у животных. Подробно описаны методы дисперсионного, регрессионного и корреляционного анализа, использованные для статистического анализа полученных автором данных.

Глава «Результаты и их обсуждение» включает последовательный анализ различий биохимических показателей обмена железа, обусловленных разделением включенных в исследование доноров на группы по уровню гликированного гемоглобина (HbA1c), с помощью дисперсионного анализа, а также корреляционных связей параметров и их количественных отношений с помощью регрессионного анализа. Помимо обнаружения достоверного снижения количества атомов меди, приходящихся на одну молекулу церулоплазмينا, находящегося в строгом соответствии со снижением ферроксидазной активности этого фермента, автор анализирует корреляции между концентрациями железа, трансферрина и железо-связывающей способностью сыворотки. Важным результатом этой части работы является разработка нового способа оценки нарушения обмена железа, основанного на определении удельной железо-связывающей способности трансферрина. Далее автор исследует причину, приводящую к снижению связывания железа трансферрином при гипергликемии, делая вывод, что в отличие от церулоплазмينا трансферрин довольно устойчив к гликированию *in vitro*. Следствием этого была проверка

возможности коррекции снижения ферроксидазной активности церулоплазмينا с помощью его лиганда и активатора, рекомбинантного лактоферрина. Действительно, при введении лактоферрина крысам, у которых гипергликемия была индуцирована стрептозотоцином, наблюдали восстановление активности церулоплазмينا, антиоксидантных ферментов эритроцитов и SH-групп в плазме крови, полученной от животных. В данном случае довольно удобным является сочетание изложения результатов работы и их обсуждения.

В разделе «Заключение» приводится обобщающий анализ выявленных в работе особенностей обмена железа при гипергликемии, а также формулируются рекомендации о способах диагностики нарушений регуляции обмена железа по удельной активности церулоплазмينا и железо-связывающей активности трансферрина, а лактоферрин предлагается в качестве компонента комплексной антигипергликемической терапии, учитывающей осложнения обмена железа при СД2.

Выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют поставленным задачам и подкрепляются полученными результатами.

**Достоверность и научная новизна** работы заключается в том, что впервые на репрезентативной выборке образцов крови осуществлен всесторонний анализ изменений ряда ключевых показателей, характеризующих обмен железа в плазме крови, выявлены корреляционные взаимосвязи между этими показателями и степенью компенсации гипергликемии при СД2. Впервые продемонстрировано изменение направленности сильной отрицательной связи между концентрацией железа и трансферрина у здоровых доноров на положительную корреляцию у пациентов с СД2. Впервые изучены показатели обмена железа у крыс со стрептозотоциновым диабетом и сильно выраженной гипергликемией. Впервые обнаружено, что гликирование церулоплазмينا в условиях *in vitro* снижает его ферментативную активность. С помощью поверхностного плазмонного резонанса – высокоточного метода, используемого для оценки белок-белковых взаимодействий, а также с помощью равновесной гель-хроматографии показано отсутствие возможности образования стабильных комплексов между церулоплазмином и трансферрином, несмотря на формирование таких комплексов между церулоплазмином и лактоферрином. Достоверность полученных результатов и выводов подкрепляется достаточным числом лиц в сформированных группах, использованием общепринятых методов для оценки биохимических показателей, а также адекватных методов математической и статистической обработки экспериментальных данных, наряду с корректной интерпретацией результатов диссертационной работы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Работа имеет существенное практическое значение, поскольку, как было отмечено выше, автор разработал подход, позволяющий более точно выявлять нарушения обмена железа при СД2, а также доказал возможность использования ферроксидазной активности церулоплазмينا, как фармакологической мишени для воздействия лактоферрина. Тем самым, недавно установленная способность лактоферрина проявлять активность антигипоксанта и воздействовать на стабильность фактора Nrf2, ответственного за антиоксидантный ответ, теперь дополнена возможностью использовать этот железопереносящий белок для коррекции нарушений обмена железа при гипергликемии, обусловленной диабетической патологией.

Теоретическое значение работы состоит в расшифровке механизмов дисбаланса обмена железа при гипергликемии, а также верификацией возможности трансляции обнаруженных нарушений функционирования церулоплазмينا при экспериментальной гипергликемии у крыс, индуцированной стрептозотоцином, на таковые у пациентов с декомпенсированной тяжелой формой СД2.

### **Оформление диссертации и автореферата**

Диссертационная работа и автореферат изложены хорошим литературным языком, оформлены согласно существующим требованиям. Содержание автореферата в полной мере отражает содержание диссертации.

По результатам ознакомления с материалами диссертационной работы возникли вопросы и комментарии, которые, однако, не носят принципиального характера и не умаляют достоинств выполненной работы, достоверности и научной значимости полученных автором результатов.

1. Автор для моделирования сахарного диабета 2-го типа использует стрептозотоциновую модель на крысах, для чего пятинедельным животным вводили стрептозоточин в дозе 43 мг/кг (это является общепринятой средней дозой препарата). Действительно, имеется немало работ, в которых такие модели рассматривают, как диабет 2-го типа у грызунов, и они упомянуты автором в «Обзоре литературы». В то же время по основным критериям эта модель в большей степени соответствует сахарному диабету 1-го типа (инсулин-дефицитному), поскольку характеризуется достаточно сильно выраженной гипергликемией и высокими показателями гликированного гемоглобина, что типично для диабета 1-го типа. Важно, что гипергликемия в этом случае обусловлена не инсулиновой

резистентностью, основным признаком диабета 2-го типа, а значительным повреждением панкреатических бета-клеток и сильно сниженной продукцией инсулина (умеренно-тяжелой инсулиновой недостаточностью). Согласно нашим данным, базовый уровень инсулина в крови крыс, обработанных стрептозотоцином в дозах 40-50 мг/кг, составляет не более 25% от такового в контроле, что является причиной устойчивой гипергликемии (уровни постпрандиальной глюкозы обычно превышают 15 мМ). Это подтверждают и данные, приведенные автором – в таблице 7 (стр. 116) уровень глюкозы составляет в среднем 40 мМ, что характерно для тяжелой формы диабета 1-го типа (уровень инсулина, к сожалению, автором не измерялся). Важно, что чувствительность к инсулину в случае такого стрептозотоцинового диабета сохранена и даже повышена, на что указывает, согласно нашим данным и данным литературы, повышение экспрессии инсулиновых рецепторов и снижение активности негативных регуляторов инсулинового сигналинга. В соответствии с вышесказанным, возникает вопрос, можно ли интерпретировать данные, полученные с использованием изученной в работе стрептозотоциновой модели, как относящиеся к сахарному диабету 2-го типа.

2. В качестве основного положения авторы пишут «В отличие от лактоферрина, между трансферрином и церулоплазмином не образуется стабильного комплекса» (положение 3). Подтверждению этого положения посвящен комплекс исследований по возможности образования комплекса между трансферрином и церулоплазмином с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса и равновесной гелепроникающей хроматографии. Результаты подробно изложены в разделе 3.4. При этом указывается, что данные, полученные автором, не согласуются с результатами ряда других работ (раздел 1.1.9.3), которые, следует отметить, были получены еще до 2010 года. В соответствии с этими ранними работами образование комплекса трансферрина и церулоплазмина необходимо для переноса связанной и затем окисленной церулоплазмином формы железа к  $Fe^{3+}$ -переносящему белку трансферрину (Eid et al., 2010). Доказанное автором отсутствие образования прочного комплекса между трансферрином и церулоплазмином – это, безусловно, важный и в практическом и в теоретическом плане результат, но не совсем ясно, как он укладывается в общую парадигму представленного исследования, в том числе, какое отношение он имеет к проблеме взаимовлияния сахарного диабета (гипергликемии) и железодефицитных состояний? Так, например, автор получил крайне интересные данные о влиянии гликирования церулоплазмина и трансферрина на их функциональную активность (раздел 3.3). Соответственно, логичным было бы проанализировать, может ли гликирование этих белков каким-либо образом влиять на возможность образования комплексов между ними,

а также на образование комплекса церулоплазмينا с лактоферрином, существование которого подтверждено как автором, так и другими исследователями. Было бы интересно узнать мнение автора о влиянии N-гликозилирования, а также избыточного гликирования белков и модификации N-гликанов при сахарном диабете на взаимодействие между белками, участвующими в метаболизме железа.

3. Почему столь высокий уровень глюкозы (около 8 мМ) показан в крови животных контрольной группы (таблица 7, стр. 116)? Вероятно, животные перед забором крови потребляли корм, в связи с чем зафиксирован и столь высокий уровень глюкозы у диабетических крыс, что необходимо было указать и обсудить в тексте диссертации. Обычно исследуют глюкозу натощак, которую легче стандартизировать.

4. Страница 37. В обзоре литературы автор приводит следующую фразу: «С другой стороны, дисфункция  $\beta$ -клеток ведет к секреции базового уровня инсулина, не вызванного ответом на стимул - повышением концентрации глюкозы [Reyot, et al., 2010].» В этой фразе допущена логическая ошибка «дисфункция ... ведет к секреции ... уровня». При этом в цитируемой работе указывается на более высокий базовый уровень инсулина у мышей, более чувствительных к высокожировой диете, и на замедленный их ответ на глюкозную нагрузку (редукция первой фазы и усиление второй фазы инсулинового секреторного ответа). Но это не означает, что повышена секреция инсулина в глюкозадефицитных условиях, а скорее свидетельствует об изменении фармакодинамики инсулина и о пролонгированной секреции инсулина при устойчивой гипергликемии, вызванной ослаблением всасывания глюкозы в условиях развивающейся инсулиновой резистентности. Что автор думает по этому поводу?

### **Заключение**

Диссертационная работа Войновой Ирины Витальевны на тему «Особенности параметров метаболизма железа при хронической гипергликемии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является завершенной научно-квалификационной работой, которая решает актуальную научную задачу выяснения механизмов нарушения обмена железа при гипергликемии. По актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов эта диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней...», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от

21.04. 2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Войнова Ирина Витальевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети "Интернет" моих персональных данных (в соответствии с Приказом Минобрнауки России №1 от 9 января 2020 г.), необходимых для работы Диссертационного совета 24.1.187.01.

**Официальный оппонент:**

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

Шпаков Александр Олегович

«08» ноября 2023 г.

194223, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

Тел: 8(812)552-31-17

E-mail: alex\_shpakov@list.ru



И.В. Мухомова  
Секретарь  
Администрации  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института эволюционной  
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской академии наук  
08.11.2023