

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующей кафедрой биологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктора медицинских наук, профессора Терехиной Натальи Александровны на диссертационную работу Звягиной Валентины Ивановны «Роль карнитина в функционировании митохондрий в условиях экспериментального дефицита NO (II) и гипергомоцистеинемии», представленную к защите в диссертационный совет 21.2.060.02 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования

Окислительный стресс, митохондриальная дисфункция лежат в основе патогенеза многих заболеваний. При окислительном стрессе, дефиците антиоксидантов нарушается работа митохондрий. Важным фактором, приводящим к митохондриальной дисфункции, является нарушение равновесия между энергопродуцирующей функцией митохондрий и образованием активных форм кислорода. Диагностика митохондриальной дисфункции и разработка способов лечения митохондриальной патологии - сложные задачи. Для коррекции митохондриальной дисфункции предложены разные способы: стимуляция биогенеза митохондрий, использование антиоксидантов (дихлорацетат, КоQ₁₀, L-карнитин, альфа-липоевая кислота) (Nahid et al., 2015). Работа Звягиной В.И. нацелена не только на поиск показателей идентификации митохондриальной дисфункции, но и на выработку наиболее оптимальной стратегии её коррекции.

Антиоксидант L-карнитин может предупреждать развитие митохондриальной дисфункции, ассоциированной с окислительным стрессом (Surai P.F. et al., 2019), способствует сохранению уровня оксида азота (NO). L-карнитин увеличивает биодоступность NO, однако этот механизм практически не исследован, поэтому разработка данного направления способна расширить знания о биологических функциях карнитина,

рассмотреть перспективность изучения возможностей его применения в качестве митохондриально-ориентированного антиоксиданта. Известно, что митохондрии служат мишенью для прямого повреждающего действия гомоцистеина (Медведев Д.В., 2018). Диссертационная работа Звягиной В.И. безусловно актуальна, поскольку посвящена изучению состояния и механизмов изменения митохондриальной активности и оценке роли карнитина в различных тканях в условиях экспериментально измененной генерации оксида азота и повышенного содержания гомоцистеина.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Диссертационное исследование Звягиной В.И. отличается высокой степенью научной новизны. Впервые установлено, что при экспериментальном дефиците NO в сыворотке крови снижаются все фракции карнитина, а в цитоплазме гепатоцитов, кардиомиоцитов, клеток головки и хвоста эпидидимиса снижается содержание общего и свободного карнитина.

Впервые установлено, что при гипергомоцистеинемии уменьшается уровень общего, свободного и связанного карнитина в сыворотке крови, цитоплазме и митохондриях клеток всех изучаемых органов.

Впервые обнаружено, что назначение карнитина хлорида при дефиците NO приводит к снижению содержания лактата в цитоплазме гепатоцитов, кардиомиоцитов, клеток головки эпидидимиса, в митохондриях клеток этих органов уровень лактата возрастает. Автором установлено, что L- карнитин способен повышать уровень метаболитов NO на фоне экспериментального снижения генерации NO, уменьшать степень окислительной модификации белков (ОМБ) и повышать активность СОД, а также уменьшать гипергомоцистеинемия, увеличивать утилизацию лактата в качестве энергосубстрата митохондриями. Это позволяет рассматривать карнитин в качестве потенциального терапевтического средства, улучшающего функциональный статус митохондрий при состояниях, связанных с нарушением генерации NO. Показано, что назначение карнитина хлорида на фоне гипергомоцистеинемии приводит к повышению содержания

метаболитов NO во всех субклеточных фракциях исследуемых органов, за исключением каудального отдела эпидидимиса.

Установлено, что использование L-аргинина (субстрата NO-синтаз) совместно с их ингибитором (L-NAME) в дозе 200 мг/кг уменьшает степень ОМБ в митохондриях гепатоцитов, кардиомиоцитов и головке эпидидимиса, приводит к повышению активности H^+ -АТФ-азы и СДГ. Установлено, что L-аргинин уменьшает степень выраженности гипергомоцистеинемии, проявляет антиоксидантные свойства, уменьшает выраженность окислительного стресса.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Представленные в диссертационной работе Звягиной В.И. научные положения, выводы, рекомендации являются обоснованными, соответствуют цели и задачам исследования. Обоснованность научных положений подтверждается корректной постановкой исследования и тщательной детальной интерпретацией полученных результатов. Работа выполнена на достаточном объеме экспериментального материала (185 крыс самцов), что позволило сформировать 11 групп животных. Для анализа использовали сыворотку крови, а также цитоплазматическую и митохондриальную фракции, полученные методом дифференциального центрифугирования из гомогенатов левого желудочка сердца, печени, головки и хвоста эпидидимиса. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации В.И. Звягиной, определяется логической структурой исследования. Автор последовательно исследует влияние дефицита оксида азота (II), вызванного применением ингибитора NO-синтаз - L-NAME в дозах 25 и 200 мг/кг на функционирование митохондрий, подробно анализирует изменение содержания фракций карнитина, изучает действие экзогенного карнитина, вводимого на фоне данных экспериментальных патологий. На модели гипергомоцистеинемии, вызванной метиониновой нагрузкой, диссертант выявляет снижение уровня

NO в исследуемых органах. Проанализирована взаимосвязь между изменением баланса фракций карнитина и нарушением генерации NO, а также между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина. Все использованные автором биохимические методы исследования информативны, современны, достаточно точны и адекватны поставленным задачам. Достаточный объем материала, современные методы исследования и грамотный статистический анализ не позволяют усомниться в обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в данной работе. Результаты работы были апробированы на 10 Всероссийских конференциях с международным участием и 6 Международных научно-практических конференциях. Формирование групп исследования, тщательный анализ и статистическая обработка данных не вызывает сомнений в достоверности полученных результатов, на основе которых были сформулированы выводы и рекомендации.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Научная значимость диссертационного исследования Звягиной В.И. не вызывает сомнений. Результаты работы расширяют фундаментальные знания о биологической роли L-карнитина в условиях сниженной генерации NO, индуцированной применением конкурентного ингибитора NO-синтаз - L-NAME и гипергомоцистеинемией, вызванной метиониновой нагрузкой. Экспериментально обосновано использование L-карнитина при митохондриальной дисфункции, ассоциированной с дефицитом синтеза NO. Новые сведения о роли карнитина в функционировании митохондрий могут быть внедрены в образовательные программы подготовки студентов и специалистов последипломного образования, использоваться в работе специализированных учреждений медицинского профиля. Протективные эффекты L-карнитина могут быть использованы для разработки новых подходов терапевтической коррекции различных патологических состояний

(сердечно-сосудистых заболеваний, болезней печени, нарушений фертильности). Научная и практическая значимость исследования подтверждена внедрением результатов в лечебно-диагностическую деятельность отделения неотложной кардиологии Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница», а также урологического отделения Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Городская клиническая больница №11» при оказании помощи пациентам с нарушением фертильности. Результаты научной работы Звягиной В.И. внедрены в производство БАД «Карнитенок», выпускаемую ЗАО «ЭКОлаб».

Содержание работы, её оформление и завершенность

Диссертация представлена в 1 томе на 270 страницах, изложена в традиционной форме, состоит из введения, главы обзора литературы, главы с описанием объектов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, заключения, выводов и рекомендаций. Список литературы включает 364 источника, в том числе 330 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 35 таблицами, содержит 78 рисунков.

Во введении автор обосновала выбор темы, ее актуальность, степень разработанности, цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, новизну, теоретическую и практическую значимость, апробацию результатов исследования на конференциях Российского и Международного уровней.

Первая глава диссертации - литературный обзор, изложен на 44 страницах, состоит из пяти подглав, написан тщательно, чувствуется знание автором литературы. Обзор отличает информативность, логика изложения материала, хороший стиль. В первой подглаве обзора описаны современные представления о функционировании митохондрий и путях регуляции их метаболизма в норме и патологии. Автор приходит к выводу, что митохондрии действуют как внутриклеточные процессоры стрессовых сигналов, способные генерировать различные мультисистемные паттерны

стресс-реакций и запускать адаптивные механизмы функционирования, а в критических ситуациях инициировать апоптоз. Вторая подглава обзора посвящена формированию и роли активных форм кислорода (АФК) в функционировании митохондрий. В третьей подглаве обзора описана роль оксида азота (NO) в функционировании митохондрий. Четвертая подглава обзора посвящена оценке влияния гипергомоцистеинемии на метаболизм митохондрий. Автор описывает метаболизм гомоцистеина, причины развития гипергомоцистеинемии. Подробно представлено повреждающее действие гомоцистеина на митохондрии. Пятая подглава обзора посвящена значению карнитина для функционирования митохондрий. Диссертант представила синтез, биологические функции карнитина и пришла к заключению о том, что карнитин является специфичным для митохондрий антиоксидантом, отвечающим за поддержание целостности митохондрий и регуляцию выработки АФК.

Во второй главе диссертации (на 19 страницах) автором детально описаны экспериментальные модели и используемые в работе методы биохимических анализов. Использование пакета современных компьютерных программ статистической обработки позволило автору проанализировать полученные данные.

Собственные исследования в третьей главе (на 127 страницах) представлены полно, полученные результаты тщательно проанализированы. Материал структурирован. Разделы главы соответствуют последовательности формулировки задач исследования. В первой подглаве третьей главы автор описывает изменение функционирования митохондрий при воздействии модуляторов синтеза NO. Выявлено, что при экспериментальном дефиците генерации NO развивается окислительный стресс, увеличивается ОМБ в митохондриях клеток всех исследуемых тканей, нарастает содержание лактата, снижается активность ферментов СДГ и H^+ -АТФ-азы, снижается содержание фракций карнитина в митохондриях и цитоплазме клеток исследуемых тканей. Вторая подглава третьей главы посвящена оценке

функционирования митохондрий при гипергомоцистеинемии. Звягина В.И. является одним из авторов модели тяжелой формы гипергомоцистеинемии. Установлено, что гипергомоцистеинемия приводит к снижению уровня метаболитов NO в сыворотке крови, субклеточных фракциях сердца, печени, головки эпидидимиса, способствует развитию окислительного стресса, повышению активности СОД, снижению активности СДГ и H^+ -АТФ-азы, снижению содержания фракций карнитина. Выявлены прямые корреляции между содержанием продуктов ОМБ в головке и хвосте придатка яичка и концентрацией гомоцистеина. Показана более высокая уязвимость митохондрий эпидидимиса к прооксидантным свойствам гомоцистеина. При повышении концентрации гомоцистеина возникает риск нарушения фертильности.

В главе "Заключение" диссертант тщательно обсудила собственные результаты и представила перспективы дальнейших исследований. Материал излагается последовательно, достаточно подробно и логично. Необходимо отметить обоснованность суждений автора и глубокое знание научной темы. Автор приходит к заключению о том, что L-карнитин необходим для поддержания нормального функционирования митохондрий и предупреждения развития митохондриальной дисфункции. Тот факт, что под действием неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME и гомоцистеина развиваются похожие изменения активности митохондриальных ферментов и содержания карнитина, лактата и окислительно-модифицированных белков, позволил диссертанту предположить, что изменение метаболизма NO создает предпосылки для нарушения редокс-регуляции митохондрий различных тканей. Увеличение активности СОД митохондрий и уменьшение соотношения спонтанных карбонилированных белков к металлиндуцированным подтвердили наличие антиоксидантного эффекта L-карнитина при экспериментальном дефиците синтеза NO и гипергомоцистеинемии. Работа завершается 10 выводами, которые закономерно вытекают из содержания работы, соответствуют цели и задачам

исследования и имеют важное научное и практическое значение. Представлены аргументированные практические рекомендации. Результаты исследований и теоретические обобщения автора неоднократно докладывались и обсуждались на конференциях различного уровня. Диссертационная работа Звягиной В.И. носит завершённый характер, оформлена в соответствии с требованиями ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Подтверждение полученных результатов диссертации в научных изданиях

По материалам диссертации опубликовано 40 научных работ, в том числе 14 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 7 из них - в изданиях, входящих в международную цитатно-аналитическую базу данных Scopus.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат имеет традиционные разделы, отвечает всем требованиям, полностью отражает суть исследования и основные положения диссертационной работы, содержит 9 рисунков и 9 таблиц.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом

Диссертация является законченным исследованием, выполненным автором на высоком научном уровне. Содержание, структура и оформление диссертационной работы Звягиной В.И. соответствуют требованиям, предъявляемым к работе на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Высоко оценивая работу Звягиной В.И., необходимо также высказать некоторые замечания по ее оформлению:

1. В списке литературы не всегда указан номер журнала.
2. В обзоре литературы при описании роли карнитина есть повторы.

Сделанные мною замечания не являются принципиальными и не умаляют значимости данной работы.

В качестве дискуссии хотелось бы задать диссертанту ряд вопросов:

1. С чем Вы связываете тот факт, что при гипергомоцистеинемии увеличивается активность СОД в митохондриях всех исследуемых органов на фоне усиления окислительной модификации белков?
2. Почему при действии карнитина хлорида в условиях гипергомоцистеинемии содержание метаболитов NO не повышалось в каудальном отделе эпидидимиса?
3. Чем обусловлен выбор тканей для исследования?
4. Почему животным первой и второй группы препарат ингибитор NO – синтазы вводили 7 дней, а крысам третьей группы субстрат NO – синтазы - L-аргинин вводили 10 дней?
5. Почему в головке эпидидимиса и в печени увеличивается концентрация ацилкарнитина при использовании L- NAME в дозе 200 мг/кг?
6. С чем Вы связываете тот факт, что введение L-аргинина в течение 10 дней в дозе 500 мг/кг не привело к изменениям концентрации метаболитов NO в митохондриях печени?

Заключение

Диссертация Звягиной Валентины Ивановны «Роль карнитина в функционировании митохондрий в условиях экспериментального дефицита NO (II) и гипергомоцистеинемии», представленная к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение важной научной проблемы по выявлению метаболических нарушений в различных тканях при митохондриальной дисфункции, ассоциированной с дефицитом NO, и обоснованию использования карнитина для их коррекции, что имеет значение для развития биохимии и медицины. По своей актуальности, научной новизне и достоверности результатов исследования,

теоретической и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Звягина Валентина Ивановна, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующая кафедрой биологической химии
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Пермский государственный медицинский
университет имени академика Е.А. Вагнера»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук (03.00.04 –биохимия),
профессор Наталья Александровна Терехина
22. 01. 2024

Терехина

Подпись д.м.н., профессора Н.А. Терехиной заверяю
Начальник отдела кадров ФГБОУ ВО ПГМУ
им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России
22. 01. 2024



И.А. Болотова

И.А. Болотова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Пермский государственный медицинский
университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
Почтовый адрес: Россия, 614990, Пермский край, г. Пермь, ул.
Петропавловская, 26
тел. +7(342) 217-20-20, e-mail: rector@psma.ru e-mail: terekhina@list.ru