

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук Гориной Екатерины Ильиничны на тему: «Воздействие бигуанидиновых производных на антиоксидантный статус крыс при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином и протамин-сульфатом» по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Выбор новых лекарственных средств от распространенного во всем мире сахарного диабета 2 типа – важная задача современного здравоохранения. Обосновывая необходимость разработки новых антидиабетических препаратов, автор отмечает участие свободнорадикальных процессов и антиоксидантных систем организма в механизмах патогенеза сахарного диабета. Проанализировав большой объем информации в специализированной базе данных, автор выбрала два бигуанидиновых производных, которые проявляют не только антиоксидантные свойства, но и, судя по литературным данным, могут являться потенциальными ограничителями развития гипергликемии и ее осложнений. Отсюда следует основная цель данной работы: выяснить медикаментозные возможности ограничения окислительного стресса при реализации модели гипергликемии у крыс. В работе, представленной Е.И.Гориной, описаны результаты исследования двух бигуанидиновых производных (БГП), использованных в качестве противодиабетических средств на двух моделях гипергликемии у крыс. Особый акцент диссертации сделан на влиянии БГП не только на уровень глюкозы в крови животных, но и на про- и антиоксидантную систему в различных органах. Широкая распространенность данного типа патологии и направленность на разработку новых лекарственных средств, а также попытка расшифровать фундаментальные основы механизма лечебного действия этих соединений – качества диссертации Е.И.Гориной, обуславливающие ее актуальность.

Относительно структуры диссертации Е.И.Гориной можно сказать, что она построена по стандартной схеме: в ней есть введение, обзор литературы, описание методической части, полученные результаты излагаются в двух главах совместно с обсуждением, есть также заключение, выводы, список цитированной литературы и приложение с большим количеством дополнительных материалов, полученных автором в ходе данного исследования, которые не вошли в основной текст диссертации.

Раздел «Введение» диссертации содержит все необходимые компоненты. Имеющиеся здесь формулировки точны и продуманны, не вызывают вопросов и возражений.

Обзор литературы посвящен таким связанным с темой диссертации проблемам как сахарный диабет, свободнорадикальное окисление, антиоксидантная система и бигуанидиновые производные. В обзоре представлены как классические представления о некоторых сторонах метаболизма, имеющих отношение к теме диссертации, так и о новейших данных в этих областях. Если обратить внимание на формулировки задач данной диссертации, то окажется, что обзор литературы охватывает практически все запланированные в экспериментальном исследовании проблемы. Отсюда можно заключить, что Е.И.Горина хорошо подготовлена теоретически к выполнению работы на заявленную тему.

При описании методической части автор отмечает как детали процедур с животными, так и биохимические методики. Текст этого раздела достаточно подробный и позволяет читателю при желании воспроизвести все экспериментальные подходы. Кроме того, хотелось бы обратить внимание на богатство биохимических методов, освоенных автором работы, на их адекватное использование для решения поставленных задач, что свидетельствует о целесообразности защиты диссертации по специальности «биохимия». Полученные в работе данные обработаны статистически, и обсуждаются лишь достоверные различия.

Описание полученных результатов автор начинает с данных по токсичности исследованных соединений – N-[имино(1-пиперидинил)метил]-гуанидина и 1,3-диметил-5-[(карбамидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата. Показано, в частности, что до концентрации 200 мг/кг исследованные соединения не проявляют признаков токсичности. Отмечу, что обычно дозировка этих веществ в данной работе не превышала 15 мг/кг. ЛД₅₀ для обоих веществ составила от 560 до 620 мг/кг.

По-видимому, именно для надежности автор использовала две модели сахарного диабета: с индукцией гипергликемии стрептозотоцином или протаминсульфатом. (Замечу, что результаты в обеих моделях получены сходные.) Эти известные модели адекватно воспроизведены и при использовании указанных индукторов уровень глюкозы в крови животных повышался в более чем 3,5 раз а, а использование обоих бигуанидинов и препарата сравнения метформина снижало концентрацию глюкозы, приближая ее к контрольным значениям.

Анализ степени свободнорадикального окисления в тканях крыс автор проводила хемилюминесцентным методом. Этот метод достаточно широко распространен в нашей стране благодаря работам академика Ю.А.Владимирова, хотя интерпретация молекулярных механизмов реакций на различных стадиях развития хемилюминесценции не всегда проста. Но Е.И.Горина и не углубляется в эти дебри, используя такие очевидные показатели как площадь под кривой хемилюминесценции, амплитуда максимальной вспышки, тангенс угла наклона прямой на этапе развития вспышки. Эти параметры дают надежную возможность оценить степень развития свободнорадикальных процессов в тканях и крови. Так, развитие гипергликемии сопровождалось интенсификацией хемилюминесценции, а противодиабетические препараты снижали амплитуду этих сдвигов. Объясняя значимость этих результатов, автор полагает, что снижение величины $tg\alpha_2$ «может быть связано с уменьшением степени мобилизации антиоксидантной системы в условиях торможения свободнорадикальных

процессов». Я бы покритиковал эту фразу, в которой нет ясности, что является первичным – уменьшение активности антиоксидантной системы или торможение свободнорадикальных процессов. Однако эта неясность частенько присутствует в публикациях и дает возможность авторам трактовать результаты по своему усмотрению (хорошо, если это делается в предположительной манере, как в данной диссертации).

Далее был проанализирован второй прямой показатель свободнорадикального окисления – концентрация диеновых конъюгатов. Это известный спектрофотометрический метод оценки степени перекисного окисления полиненасыщенных липидов. Довольно трудоемкий метод, поскольку связан с экстракцией гомогенатов тканей гидрофобными растворителями. Полученные результаты позволили сделать сходный с предыдущим экспериментом вывод о том, что при гипергликемии свободнорадикальное окисление активизируется, а бигуанидиновые препараты ингибируют этот процесс. В целом я согласен с таким выводом, однако покритикую единицы измерения диеновых конъюгатов – мкмоль/г. Дело в том, что спектр конъюгатов при 233 нм не представляет собой кривую с четко выраженным максимумом, т.к. он находится на склоне гораздо более выраженного спектра неконъюгированных связей. Поэтому при расчете концентрации по оптической плотности при 233 нм будут получены значительно завышенные данные. Хотя сути дела это не меняет, однако более корректно выбрать другие единицы измерения, например, ед.ОП₂₃₃/г.

Как известно, окислительной модификации при развитии свободнорадикальных процессов подвергаются все компоненты клетки. Следующим экспериментом автор демонстрирует, что белки также подвергаются окислению при обеих моделях диабета, а бигуанидины затормаживают этот процесс.

Без сочетанного анализа уровня свободнорадикального окисления и состояния компонентов антиоксидантной системы невозможно сделать более определенный вывод о причинах происходящих биохимических сдвигах в

организме при развитии сахарного диабета. В рецензируемом диссертационном исследовании автор показала активацию двух основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы – при моделировании диабета у крыс. Эти данные могут свидетельствовать о компенсаторном повышении активности данных ферментов в ответ на интенсификацию свободнорадикального окисления. Появление в организме новой порции антиоксидантов в виде бигуанидинов снимает необходимость поддержания высокого уровня активности эндогенных антиоксидантных ферментов, вследствие чего наблюдается снижение этого уровня. Аналогичная картина наблюдалась при оценке активности другой группы ферментов, связанных с глутатионом.

Обратная логика строится при рассмотрении содержания восстановленного глутатиона. Развитие окислительных процессов при гипергликемии приводит к усиленному потреблению этого метаболита ферментами, утилизирующими продукты окисления. Облегчение свободнорадикальной нагрузки бигуанидинами сопровождается восстановлением концентрации глутатиона.

Еще один подход – оценка уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс – подтвердил результаты, полученные при определении активности ферментов. Хотелось бы лишь отметить, что более надежным критерием является определение активности, а не биосинтеза ферментов, который отражает возможность активации, а не реальный эффект.

Финальный комплекс исследований выполнен по определению активности ряда ферментов окислительного метаболизма, которые могут иметь опосредованное отношение к показателям свободнорадикального окисления и его регуляции.

В разделе «Заключение» Е.И.Горина логично рассуждает о полученных результатах, выстраивает четкую картину происходящих изменений в

метаболизме при гипергликемии, что завершается построением схемы взаимосвязей всех оцененных показателей.

Существенных замечаний к диссертации у меня не возникло. Из несущественных можно отметить следующие:

На рис. 1 в автореферате не указано, почему в каждой серии представлены по три столбика. Аналогичный рис. 8 в диссертации также не содержит этих пояснений.

Приводимые в разделе «Методы» формулы расчета концентрации диеновых конъюгатов выглядят довольно сложными, однако большинство параметров там являются константами, поэтому формула в итоге может быть выражена просто неким коэффициентом, помноженным на величину оптической плотности. Кроме того, параметр “m” в первой формуле не расшифрован.

В таблице 4, описывающей метод определения карбонильных производных белков, не указана концентрация мочевины.

С тер мином «карбонильные соединения белков» надо быть осторожнее, т.к., насколько я понимаю, эти соединения образуются в ходе реакции окисленных белков с динитрофенилгидразоном в пробирке, а не *in vivo*. Поэтому такую фразу как «содержание карбонильных соединений в печени крыс» (стр. 76) нельзя признать правильной.

Можно заключить, что полученные при проведении данного исследования результаты обладают новизной и оригинальностью, а сделанные выводы вполне обоснованы и логичны.

Название диссертации соответствует ее главному содержанию, автореферат отражает основное содержание работы и главные полученные в ходе исследований данные и заключения.

Е.И.Горина является соавтором нескольких научных публикаций по теме диссертации. Работа не раз докладывалась на научных конференциях, что свидетельствует о полноценной апробации полученных результатов.

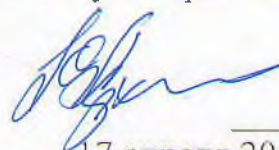
Сделанные в данном отзыве замечания не носят принципиального характера или являются дискуссионными, поэтому не могут повлиять на высокую оценку этой замечательной диссертационной работы.

Заключение

Таким образом, диссертация Екатерины Ильиничны Гориной «Воздействие бигуанидиновых производных на антиоксидантный статус крыс при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином и протамин-сульфатом», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны новые теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области биохимии сахарного диабета и разработке новых антигипергликемических лекарственных средств. Представленная к защите диссертация соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям критериям, установленным «Положением о порядке присуждения учёных степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, п. 9, а её автор Е.И.Горина, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории
адаптационной медицины на факультете фундаментальной медицины
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»
Архипенко Юрий Владимирович



17 апреля 2019 года

Контактные данные:

тел.: 8(968)4080310, e-mail: yva1950@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 14.03.03 - Патологическая физиология, 03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

119192, Российская Федерация г. Москва, Ломоносовский проспект., д. 27.,
корп. 1. Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины
Тел.: 8(495)9329910, e-mail: arhipenko@fbm.msu.ru

Подпись Архипенко Ю.В. удостоверяю.

Декан факультета фундаментальной медицины
МГУ имени М.В.Ломоносова, академик



В.А.ТКАЧУК