

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Г.К. Рубцова «Модельная биологическая система желточных липопропротеидов: параметры спонтанной и Fe²⁺-инициированной окислительной модификации белков в комплексе с уровнем молекул средней массы», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

В последние десятилетия произошел взрывной рост числа исследований окислительного стресса, включая изучение окислительной модификации белков. Существует ряд работ, в которых было продемонстрировано наличие определенной ассоциации между окислительной модификацией белков и образованием молекул средней массы. Основные результаты в этой области были получены в экспериментах *in vitro* на целых организмах. С другой стороны, сопоставить возможные изменения в степени окислительной модификации белков и в уровне молекул средней массы под воздействием тех или иных химических соединений одновременно в бесклеточной модельной системе *in vitro* и в организме *in vivo* было бы достаточно интересно.

В связи с вышесказанным полезной оказалась бы разработка аналитических подходов, позволяющих определять в одной и той же пробе биологического материала как содержание молекул средней массы, так и степени окислительной модификации белков. В этом смысле предложенный Г.К. Рубцовым способ определения уровня окислительной модификации белков и молекул средней массы (патент на изобретение Российской Федерации № 2525437, в соавторстве) мог бы предоставить исследователям метод, позволяющий как уменьшить расход биологического материала, так и снизить трудоемкость проведения

анализа. Следует отметить, что наличие патента на изобретение служит подтверждением новизны предложенного аналитического подхода.

Таким образом, можно констатировать, что проведенное Г.К. Рубцовым исследование маркерных параметров оценки уровня спонтанной и Fe^{2+} -инициированной окислительной модификации белков, коррелирующих с уровнем молекул средней массы, на модельной биологической системе желточных липопротеидов актуальным и целесообразным на текущий момент развития научных знаний.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах машинописного текста.

Во введении дано аргументированное обоснование темы диссертации. В следующей главе автором суммированы современные представления о молекулах средней массы и их биологической и медицинской значимости, а также о значении, механизмах образования и способах изучения окислительной модификации белков. Особое внимание соискателем уделено вопросам комплексного подхода к изучению параметров окислительной модификации белков и уровня молекул средней массы *in vivo* и возможностям их исследования в модельных бесклеточных тест-системах.

Соискатель провел глубокий анализ и обобщил сложившиеся в современной литературе не только общие представления об оценке степени окислительной модификации белков и уровня молекул средней массы, но и частные вопросы, касающиеся возможностей их применения в клинической биохимии. Анализ опубликованных данных позволил автору сформулировать цель исследования как «предложить маркерные параметры оценки уровня спонтанной и Fe^{2+} -инициированной

окислительной модификации белков, коррелирующие с уровнем молекул средней массы, и обосновать диапазоны их чувствительности к изменению условий процессов свободно-радикального окисления на модельной биологической системе желточных липопротеидов» и обосновать выбор модельной биологической системы на основе использования желточных липопротеидов, которые доступны с точки зрения их получения и отличаются достаточно хорошей чувствительностью к окислению.

В главе, посвященной экспериментальной части и методам исследования, описана схема проведения экспериментов на модельной биологической системе желточных липопротеидов в условиях спонтанной и Fe^{2+} -индуцированной окислительной модификации белков, регистрируемой по изменению концентрации карбонильных соединений, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином, в комплексе с уровнем молекул средней массы. Выбор экспериментальной модели, исследуемых веществ, использованных биохимических методов исследований и методов статистической обработки полученных результатов соответствует поставленным задачам исследования.

Автором диссертации рассмотрены в комплексе уровни окислительной модификации белков и молекул средней массы на модельной биологической системе желточных липопротеидов, продуктах пчеловодства как вещества природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотке крови экспериментальных животных (крысы). Изучены изменения уровней исследованных параметров при введении в модельную биологическую систему продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и/или сыворотки крови экспериментальных животных (крысы), что позволяет сделать заключение о чувствительности использованных тест-систем к введению в них веществ и сложных смесей природного происхождения, способных влиять на протекание процессов

свободно-радикального окисления. При этом, по полученным соискателем данным, регистрация степени окислительной модификации белков по образованию динитрофенолгидразонов соединений с карбонильными группами на длинах волн 430 и 530 нм может иметь преимущества в сравнении с использованием регистрации на длинах волн 360 и 375 нм.

В работе получены новые данные о параметрах окислительной модификации белков и молекул средней массы и их корреляционных взаимосвязях на модельной биологической системе желточных липопротеидов. Проанализированы эффекты продуктов пчеловодства с антиоксидантным действием и сыворотки крови крыс при их отдельном добавлении на окислительную модификацию белков и образование молекул средней массы при Fe^{2+} -индуцированном окислении желточных липопротеидов при добавлении продуктов пчеловодства как веществ природного происхождения, обладающих антиоксидантным действием, и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы). Интересным представляется обнаруженное увеличение степени окислительной модификации белков, регистрируемой при длине волны 430 нм, в условиях Fe^{2+} -индуцированного окисления при добавлении к желточным липопротеидам сыворотки крови или продуктов пчеловодства. Кроме того, важным является обнаруженный соискателем факт заметных различий в эффектах образцов сыворотки крови крыс, полученных от животных различного пола.

Также в модельной системе на основе желточных липопротеидов было изучено совместное воздействие продуктов пчеловодства и сыворотки крови экспериментальных животных (крысы). Это позволило более обоснованно подойти к вопросу о значимости различных вариантов оценки степени окислительной модификации белков и её корреляций с уровнем молекул средней массы в бесклеточной тест-системе. Полученные результаты позволили соискателю сделать вывод о чувствительности

исследованной бесклеточной модельной системы к условиям спонтанного и Fe^{2+} -индуцированного окисления.

Достоинством рецензируемой работы является то, что соискатель сопоставляет полученные им в бесклеточной тест-системе на основе желточных липопротеидов результаты с опубликованными сведениями для других модельных систем.

Проведенные эксперименты позволили автору работы выявить ряд определенных закономерностей между окислительной модификацией белков и образованием молекул средней массы и предложить подходы, способные помочь дальнейшему развитию методологии комплексного изучения и оценки степени окислительной модификации белков и содержания молекул средней массы. Экспериментальные данные, характеризующие особенности модификации белков в желточных липопротеидах в условиях спонтанного и Fe^{2+} -индуцированного окисления могут представлять интерес для расширения научных представлений о влиянии различных индукторов и ингибиторов свободно-радикального окисления на окисляемость соединений белковой природы в зависимости от характеристик и состава бесклеточных модельных систем.

Выводы работы соответствуют поставленным целям и задачам и полностью отражают полученные автором работы результаты. Автором также сформулированы практические рекомендации по использованию полученных экспериментальных результатов и выявленных закономерностей.

В целом работа оставляет благоприятное впечатление: четко выделяется личный вклад соискателя в разработку изучаемой научной проблемы, эмпирический материал репрезентативен; научные положения, выводы и практические рекомендации, содержащиеся в диссертации, вполне обоснованы и логичны; научная новизна и актуальность работы не вызывают сомнений. Вместе с тем, можно высказать некоторые замечания

и предложения автору, носящие дискуссионный характер и не снижающие качество проделанной работы.

1. Для более глубокого понимания характера и механизмов окислительной модификации белков, развивающиеся в ответ на введение в модельную биологическую систему желточных липопротеидов различных веществ, было бы целесообразным проследить изменения уровней изучаемых параметров в комплексе с тестами оценки интенсивности перекисного окисления липидов. В ранее проведенных исследованиях было показано, что изменение концентрации карбонильных соединений, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином может быть использовано для оценки интенсивности перекисного окисления липидов в липосомальных модельных системах, в том числе при инициации перекисного окисления липидов металлами переходной валентности. Возможно, окисление желточных липопротеинов также приводит к образованию карбонильных групп в соединениях липидного происхождения, а не только в белках.

2. Известно, что осаждение и последующее перерастворение белков при оценке содержания карбонильных продуктов их окислительной модификации с использованием 2,4-динитрофенилгидразина может приводить к переменным потерям белка с осадком. Весьма вероятно, что определение содержания белка в реакционной смеси непосредственно перед регистрацией содержания динитрофенилгидразонов и расчет удельного содержания карбонильных соединений позволило бы обнаружить более тонкие различия между исследованными образцами.

По результатам рецензирования данной работы возникло несколько вопросов к соискателю, а именно:

1. Из работы недостаточно очевидно, почему для оценки степени окислительной модификации белков по образованию динитрофенилгидразонов были выбраны сразу четыре длины волны, а

именно 356, 370, 430 и 530 нм? Чем объяснить, что в изученной автором модельной системе более значительные изменения наблюдались при регистрации на длинах волн 430 и 530 нм?

2. Известно, что билирубин, являющийся постоянным компонентом сыворотки крови млекопитающих, обладает очень сильным поглощением в диапазоне длин волн 380-490 нм. Возможно, следует учитывать наличие или отсутствие интерференции с билирубином при регистрации динитрофенилгидразинов на длине волны 430 нм в экспериментах с использованием сыворотки крови крыс?


3. Каким образом можно было бы объяснить наличие различий в результатах экспериментов, в которых использовались образцы сыворотки крови крыс, полученных от животных различного пола?

Рецензируемая работа представляет собой законченное исследование, направленное на решение важной для фундаментальной и клинической биохимии научной задачи, а именно усовершенствования методов анализа и исследования маркеров окислительного стресса для оценки степени интоксикации организма. Тема диссертации соответствует требованиям паспорта заявленной специальности – 03.01.04 «биохимия». Задачи, сформулированные автором, решены полностью. Достоверность результатов не вызывает сомнений.

Автореферат и опубликованные статьи полностью отражают содержание диссертации, полученные результаты апробированы на научно-практических конференциях, включая международные. В изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней, автором опубликовано 9 работ по теме рецензируемой диссертации.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней.

Таким образом, диссертационная работа Г.К. Рубцова «Модельная биологическая система желточных липопротеидов: параметры спонтанной и Fe²⁺-инициированной окислительной модификации белков в комплексе с уровнем молекул средней массы» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи (повышение информативности параметров окислительной модификации белков и молекул средней массы и изучение их в комплексе), имеющей существенное значение для биохимии, и полностью отвечает требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук (по специальности 03.01.04 – «биохимия»), а ее автор – Рубцов Георгий Константинович – заслуживает присвоения искомой ученой степени.

Доцент кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ФГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», кандидат биол. наук  В.Г. Зайцев

400131, Волгоградская область, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.
Тел. 8 (8442) 38-53-63

22.12.2014 г.



Подпись топ. 
УДОСТОВЕРЯЮ
Начальник управления кадров

Волгоградского государственного
медицинского университета