

УТВЕРЖДАЮ

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный медицинский
университет имени академика И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор

Р.Е. Калинин



05 сентября 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Роль карнитина в функционировании митохондрий в условиях экспериментального дефицита NO (II) и гипергомоцистеинемии» выполнена на кафедре биологической химии.

В период подготовки диссертации соискатель Звягина Валентина Ивановна работала в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре биологической химии в должности доцента.

В 1990 году окончила Рязанский медицинский институт имени академика И.П. Павлова по специальности «фармация».

В 1999 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Взаимодействие андрогенов и карнитина в регуляции активности ферментов лизосом и цикла ди- и трикарбоновых кислот в мужских добавочных половых железах крыс» по специальности «Биохимия».

Работает на кафедре биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в должности доцента.

Научный консультант – Шумаев Константин Борисович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха, старший научный сотрудник.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Митохондрии являются жизненно важными органеллами эукариотических клеток. Помимо производства энергии и клеточного дыхания они выполняют и другие ключевые функции, в том числе сигнальные. Любое нарушение регуляции данных процессов может приводить к возникновению митохондриальной дисфункции и развитию заболеваний.

Фракции карнитина (общего, свободного и связанного с различными ацильными остатками) представляют собой компонент, имеющий важную роль для поддержания нормального функционирования митохондрий и участвующий в формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма к неблагоприятным воздействиям.

К основным функциям L-карнитина принято относить транспорт остатков жирных кислот внутрь митохондрий, где они окисляются с высвобождением энергии. Наряду с этим недавно установлено, что L-карнитин может предупреждать развитие митохондриальной дисфункции, ассоциированной с оксидативным стрессом, вызванным различными повреждающими агентами, к которым может относиться и гомоцистеин, однако, механизмы этого остаются не изученными. Накопившиеся научные данные свидетельствуют о том, что активность митохондрий может модулироваться как АФК, так и оксидом азота (NO).

Предполагается наличие взаимосвязи между нарушением NO-сигнализации и развитием митохондриальной дисфункции в условиях изменения гомеостаза карнитина, что стало предпосылкой к исследованию роли L-карнитина в функционировании митохондрий и перспектив целенаправленного его использования в фармакотерапии заболеваний.

Для более полного изучения регуляторной роли NO в митохондриях важным является исследование факторов, способных оказывать влияние на уровень генерации NO. Одним из них является повышенный уровень гомоцистеина, повреждающее действие которого связывают с активацией окислительного стресса, ведущего к повреждению эндотелия и развитию эндотелиальной дисфункции. При этом системные эффекты, связанные с гомоцистеин-индуцированной митохондриальной дисфункцией в других типах клеток и тканей, остаются мало изученными.

Метаболическое направление лечения митохондриальной дисфункции, позволяющее уменьшить выраженность симптомов заболеваний, пока является малоэффективным. В этой связи перспективными представляются исследования, сфокусированные на применении митохондриально-ориентированных антиоксидантов, способных корректировать сдвиги, вызванные в организме окислительным повреждением и нарушением.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором самостоятельно выполнен обзор литературы по изучаемой проблеме, составлен дизайн исследования, проведены эксперименты на животных, биохимические исследования, обработка и интерпретация данных, публикация научных статей по теме диссертационной работы.

Объем и характер заимствованных фрагментов текста диссертации позволяют считать их законными цитатами.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью программ Microsoft Office Excel 2013, StatSoft Statistica 10.0, «GraphPad Prism 9.0». Для проверки наличия отклонений распределения от нормального использовали многосторонний критерий Шапиро-Уилка (W-критерий) согласно ГОСТ Р ИСО 5479-2002. Так как распределение полученных данных отличались от нормального для описания показателей использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1 и Q3), результаты представляли в форме Me [Q1, Q3]. Для анализа статистической значимости различий независимых выборок по количественному признаку использовали критерий Краскела-Уоллиса и U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений или U-критерий Манна-Уитни при сравнении 2 групп. Анализ корреляционных взаимосвязей осуществлялся с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

В работе использованы современные, адекватные цели и задачам исследования, методики: спектрофотометрические, колориметрические, дифференциальное центрифугирование, метод иммуноферментного анализа.

Достоверность первичных материалов подтверждена их экспертной оценкой и не вызывает сомнений. Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований и логически вытекают из результатов исследования.

В исследовании использован достаточный объем литературных источников как отечественных, так и иностранных авторов.

Новизна результатов проведенных исследований

Автором впервые установлено, что подавление генерации NO ведет к снижению общего и свободного карнитина в сыворотке крови и цитоплазме клеток всех исследуемых органов крыс, в митохондриях подобные изменения были зафиксированы только в головке эпидидимиса. Впервые обнаружен ранее неизвестный феномен того, что назначение карнитина хлорида в условиях экспериментального L-NAME-опосредованного дефицита NO приводит к снижению уровня молочной кислоты в цитоплазме клеток печени, головки эпидидимиса, при

дозе L-NAME 200 мг/кг также и в сердце. При этом уровень лактата в митохондриальной фракции возрастает в сердце, печени и головке эпидидимиса. Карнитина хлорид способствует повышению концентрации лактата в митохондриях головки эпидидимиса и в условиях гипергомоцистеинемии.

Выявлено, что гипергомоцистеинемия, опосредованная метиониновой нагрузкой, приводит к снижению концентрации метаболитов NO как в сыворотке крови, так и в митохондриях исследуемых органов. Экспериментальная гипергомоцистеинемия сопровождается повышением уровня окислительно-модифицированных белков с сопутствующим увеличением активности СОД в митохондриях сердца, печени, головки и хвоста эпидидимиса крыс.

Получены новые данные о возможности L-аргинина уменьшать степень выраженности гипергомоцистеинемии и корректировать вызванное индукторами окислительного стресса нарастание содержания окислительно-модифицированных белков митохондрий.

Впервые обнаружено, что при тяжелой форме гипергомоцистеинемии происходит значительное снижение уровня общего, свободного и связанного карнитина во всех исследуемых фракциях и органах.

Впервые продемонстрировано, что назначение карнитина хлорида на фоне моделируемой гипергомоцистеинемии предупреждает повышение уровня гомоцистеина в сыворотке крови и сопровождается нарастанием концентрации метаболитов оксида азота во всех исследуемых фракциях и органах, за исключением хвостовой части эпидидимиса.

Обнаружено наличие сильной положительной взаимосвязи между уровнем NO и содержанием общего и связанного карнитина в сыворотке крови, между содержанием NO и концентрацией свободного карнитина в митохондриях сердца и цитоплазме головки эпидидимиса. Выявлено, что между концентрацией гомоцистеина и общего карнитина в сыворотке крови и в митохондриальной фракции сердца и головки эпидидимиса обнаружена сильная, а в печени и хвосте средняя отрицательная корреляционная связь.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Установленные в процессе данного исследования результаты 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.

Выявленные в исследовании схожие паттерны изменений активности митохондриальных ферментов и содержания карнитина, лактата и окислительно-модифицированных белков под действием неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME и гомоцистеина позволяют предположить, что изменение метаболизма NO создает предпосылки для нарушения редокс-регуляции митохондрий различных тканей.

Описанные протективные эффекты L-карнитина, связанные с его способностью уменьшать степень выраженности гипергомоцистеинемии и увеличивать утилизацию лактата в качестве энергосубстрата митохондриями в условиях ограничения β -окисления жирных кислот, возможностью повышать уровень метаболитов NO на фоне экспериментального снижения генерации NO, способностью уменьшать окислительную модификацию белков и повышать активность СОД дополняют представления о его биологической роли и могут быть использованы для разработки новых подходов терапевтической коррекции различных патологических состояний.

Ценность научных работ соискателя

Проведенные исследования позволили углубить представления о терапевтическом потенциале L-карнитина и стали основой для дальнейших исследований его применения с целью коррекции процессов, ассоциированных с нарушением редокс-регуляции, сопровождающейся изменением NO-опосредованной регуляции митохондрий и способностью выводить токсические метаболиты.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена проблеме расширения фундаментальных знаний о

биологической роли L-карнитина, его терапевтическом потенциале при состояниях, связанных с развитием вторичной митохондриальной дисфункции, ассоциированной с дефицитом синтеза NO (II). Она соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

**Полнота изложения материалов диссертации в работах,
опубликованных соискателем**

По материалам диссертации опубликовано 40 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 14 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 7 – в изданиях, индексируемых в международной цитатно-аналитической базе данных Scopus.

1. Медведев, Д.В. Изучение окислительных процессов в ткани сердца крыс при моделировании дефицита оксида азота / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – Т.28, № 2. – С. 92-96.

2. Медведев, Д.В. Воздействие донора оксида азота (II) L-аргинина на активность митохондриальных оксидоредуктаз и окислительные процессы в ткани сердца крыс в условиях дефицита оксида азота / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, Э.С. Бельских, Д.В. Фрольцов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 8 – С. 1087-1091.

3. Медведев, Д.В. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И. Звягина, М.А. Фомина // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – № 4. – С. 42-46.

4. Медведев, Д.В. Метаболизм митохондрий клеток сердца при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-4 – С. 734-739.

5. Звягина, В.И. Влияние карнитина хлорида на функциональное состояние митохондрий в условиях дефицита синтеза оксида азота (II) / В.И. Звягина, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских, О.М. Урясьев // Пермский медицинский журнал. – 2015. – Т.32, №3. – С. 108-114.

6. Звягина, В.И. Изучение функционального состояния митохондрий придатка яичка крыс в условиях изменения синтеза оксида азота (II) / В.И. Звягина, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских, Н.А. Головач // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т.96, №5. – С. 837-843.

7. Медведев, Д.В. Изучение дисфункции митохондрий кардиомиоцитов в условиях гипергомоцистеинемии и дефицита оксида азота. / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т.96, №5. – С. 814-818.

8. Медведев, Д.В. Изучение биохимических механизмов развития дисфункции митохондрий гепатоцитов при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Вопросы питания. – 2016. – №1. – С. 29-35.

9. Медведев, Д.В. Молекулярные механизмы токсического действия гомоцистеина / Д.В. Медведев, В.И. Звягина // Кардиологический вестник. – 2017. – Т.12, №1. – С. 52-57.

10. Звягина, В.И. Биохимические изменения, возникающие в митохондриях придатка яичка крыс на фоне назначения карнитина хлорида, при экспериментальной гипергомоцистеинемии / В.И. Звягина, Д.В. Медведев, Э.С. Бельских // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. – 2017. – Т.27, №3. – С. 344-350.

11. Метаболические изменения в митохондриях легких при экспериментальной гипергомоцистеинемии у крыс / Д.В. Медведев [и др.] // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63, №3. – С. 248-254. (соавт. Звягина В.И., Урясьев О.М., Бельских Э.С., Булатецкий С.В., Рябков А.Н.)

12. Влияние карнитина хлорида на митохондрии сердца крыс при моделировании гипергомоцистеинемии / В.И. Звягина [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2018. - №1. – С. 78-81 (соавт. Бельских Э.С., Урясьев О.М., Медведев Д.В., Киселева В.А., Твердова Л.В.)

13. Zvyagina, V.I. Carnitine chloride reduces the severity of experimental hyperhomocysteinemia and promotes the utilization of lactate by the mitochondrial fraction of the rat epididymis / V.I. Zvyagina, E.S. Belskikh // Biochemistry (Moscow).

Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2021. – V.15, No.4. – P. 326-336.

14. Zvyagina, V.I. Comparative assessment of the functional activity of rat epididymal mitochondria in oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia and L-NAME administration / V.I. Zvyagina, E.S. Belskikh // Journal of evolutionary biochemistry and physiology. – 2022. – T.58, №2. – P. 364-379.

Диссертация «Роль карнитина в функционировании митохондрий в условиях экспериментального дефицита NO (II) и гипергомоцистеинемии» Звягиной Валентины Ивановны рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на межкафедральном заседании кафедр: фармакологии; патофизиологии; фармацевтической химии; фармацевтической технологии; биологии; факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша; фармакогнозии; биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Присутствовало на заседании профессорско-преподавательского состава 12 человек. Результаты голосования: «за» – 12 человек; «против» – нет; «воздержались» – нет (протокол №1 от 15 мая 2023 года).

Председатель межкафедрального совещания,
заведующий кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

Якушева Елена Николаевна

Подпись профессора Якушевой Е.Н. заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор

Сучков Игорь Александрович

