

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Честновой Анны Юрьевны «Содержание и структура гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 — «Клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность работы.

Известно, что одна из основных функций печени — поддержание постоянного уровня глюкозы в крови — осуществляется за счет способности клеток паренхимы печени (гепатоцитов) запасать гликоген, синтезируя его из глюкозы после приема пищи и расщепляя в соответствии с требованиями организма. Установлено, что при циррозе печени метаболизм глюкозы и гликогена нарушается, характеризуясь повышенным уровнем гликогена в гепатоцитах и изменением его структуры. Однако, несмотря на то, что активное исследование гликогена ведется на протяжении более 100 лет и его метаболизм изучен довольно подробно, сведения о влиянии тканевых и клеточных факторов на содержание гликогена в клетках во многом остаются неясными. Данные о пространственной структуре этой важной макромолекулы являются крайне скудными, а конкретные механизмы ее изменений пока остаются неизвестными. Поэтому детальное исследование Анны Юрьевны Честновой, выполненное на современном методическом уровне и посвященное исследованию влияния клеточных факторов на метаболизм гликогена и анализу структуры его молекул в гепатоцитах нормальной и патологической измененной печени, безусловно, актуально.

Научная новизна.

Данные, полученные автором о влиянии размера гепатоцитов на содержание гликогена в нормальной и цирротической печени крысы и человека, являются новыми и интересными. В частности, автором впервые установлено, что содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени зависит от их размера: чем больше клетка, тем больше в ней гликогена, тогда как в цирротической печени подобная зависимость отсутствует.

Также новый и существенный для понимания функций печени результат состоит в том, что в процессе гликогенеза сухая масса гепатоцитов и содержание в них гликогена

как в нормальной, так и в цирротической печени крысы изменяются пропорционально ploидности клеток.

Автором установлено, что накопление гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы связано не с синтезом новых его β -частиц, а с увеличением степени заполнения ярусов в частицах, уже имеющихся в клетках, тогда как накопление гликогена в гепатоцитах человека в ходе развития цирроза печени происходит, главным образом, за счет увеличения количества β -частиц. Этот вывод диссертации А.Ю. Честновой является приоритетным.

Кроме того, автором впервые показано и количественно обосновано с помощью метода FRET (Förster Resonance Energy Transfer), что по мере заполнения внешних ярусов β -частиц остатками глюкозы расстояние между ярусами уменьшается, что свидетельствует о саморегуляции размеров молекулы гликогена.

Научно-практическая значимость диссертационной работы.

Несмотря на то, что исследование, в первую очередь, имеет фундаментальную направленность, можно отметить, что некоторые данные, такие как наличие или отсутствие зависимости между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена, соотношение прогликогена и макрогликогена в клетках, могут служить показателем тяжести поражения печени при циррозе, использоваться для прогноза этого заболевания и, возможно, учитываться при разработке лекарственной терапии.

Апробация результатов.

Материалы диссертации были представлены на семи международных и восьми российских конференциях. Результаты, полученные автором, опубликованы в шести статьях в международных и российских журналах, в том числе пять из них — в журналах, рекомендуемых ВАК. Кроме того, часть результатов диссертации была опубликована в виде главы иностранной монографии.

Структура и содержание работы.

Диссертационная работа Честновой Анны Юрьевны построена по традиционному плану и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 176 страницах и содержит ссылки на 444 литературных источника. Работа иллюстрирована 76 рисунками и 8 таблицами.

Диссертация А.Ю. Честновой написана продуманно и четко. По смысловой части «Введения» и «Обзора литературы» замечаний почти нет. В обзоре подробно изложены и обсуждены особенности метаболизма гликогена в некоторых тканях и клетках млекопитающих при различных физиологических состояниях; тканевые и клеточные факторы, влияющие на метаболизм гликогена; нарушения метаболизма гликогена в печени; структура молекулы гликогена; основные принципы метода FRET.

Хотя глава «Обзор литературы» читается интересно, на мой взгляд, ее можно было бы немного сократить. Так, например, совсем не обязательно было включать в раздел 1.3. рисунки 7 и 9; можно было сократить описание наследственных гликогенозов в разделе 1.5.

В главе «Материалы и методы» описано, как экспериментальная модель цирроза печени воспроизводилась диссертантом на белых беспородных крысах-самцах, подвергавшихся хроническому ингаляционному воздействию четыреххлористого углерода. Кроме того, в работе был использован биопсийный материал печени больных хроническим гепатитом и циррозом.

Хорошее впечатление производит описание примененных методов. Диссертант широко использовал гистологические, цитохимические и цитофотометрические методы анализа, что находится в точном соответствии со специальностью – клеточная биология, цитология, гистология. Особенно хочется отметить тот факт, что для исследования структуры гликогена в отдельных клетках автором был разработан оригинальный микрофлуориметрический метод, включающий в себя несколько этапов: 1) испытание флуоресцентных красителей, различающихся по химической структуре, на предмет использования их в качестве заменителей основного фуксина в реактиве Шиффа при проведении PAS-реакции; 2) выбор пары красителей, способных не только специфично выявлять гликоген при использовании их в PAS-реакции, но и обладающих соответствующими спектральными характеристиками для применения их в качестве донора и акцептора при проведении FRET анализа гликогена в клетках; 3) исследование зависимости интенсивности окрашивания гликогена в гепатоцитах с помощью выбранных реактивов типа Шиффа разного цвета от времени окрашивания в реактиве и определение оптимальных условий окрашивания препаратов для выявления прогликогена и макрогликогена; 4) вычисление фёрстеровского расстояния, R_0 , для пары красителей, которые предполагалось использовать в качестве донора и акцептора при проведении исследований внутренней структуры β -частиц гликогена в клетках с помощью метода FRET.

В целом можно сказать, что тщательно разработанная схема опытов не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов.

Глава «Результаты» состоит из 16 разделов и включает в себя очень подробное и полное описание всей экспериментальной части работы и производит самое благоприятное впечатление. Материал представляют хорошие микрофотографии, информативные графики и таблицы.

К этой главе у меня есть только небольшие замечания. Два термина, которые использует автор, не вполне привычны для русского текста: «рефининг» и «постабсорбтивный» период.

На странице 123 приведена следующая фраза: «Используя процедуру АВ (Acceptor Bleaching) можно получить сведения не только о структуре частиц гликогена, но и морфологически выразить передачу энергии от донора к акцептору в виде изображений областей клеток, на которых представлено распределение эффективности сигнала FRET в цитоплазме гепатоцитов». Сочетание слов «...морфологически выразить передачу энергии ...» кажется не совсем удачным.

В главе «Обсуждение результатов» автор привлекает большое количество литературных данных для детального и критичного обсуждения собственных результатов. Этот раздел демонстрирует владение диссертантом информацией в данной области и умение интерпретировать полученные результаты.

На основании полученных результатов Анна Юрьевна делает семь вполне обоснованных выводов, содержание которых соответствует поставленным задачам.

Несмотря на то, что «Список литературы» содержит большое количество источников, оформлен он очень аккуратно.

По фактическому материалу диссертации замечаний у меня нет. Автореферат соответствует содержанию диссертации и вполне его отражает.

Заключение

Диссертационная работа Честновой Анны Юрьевны «Содержание и структура гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 — «Клеточная биология, цитология, гистология», является фундаментальным исследованием, содержит большой фактический материал, существенно пополняющий имеющиеся сведения по обмену гликогена и его структуре в гепатоцитах как нормальной, так и патологически измененной печени крысы и человека.

По актуальности темы, научной новизне, методическому уровню, объему выполненных исследований и достоверности полученных результатов диссертация полностью соответствует основным квалификационным требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Честнова Анна Юрьевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 — «Клеточная биология, цитология, гистология».

Ведущий научный сотрудник Лаборатории органов чувств
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова Российской академии наук
доктор биологических наук по специальности
03.00.13 — физиология человека и животных;
03.00.11 — эмбриология, гистология и цитология.

05.10.2016 г.

Г.А. Савостьянов

Адрес: 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,

Телефон: +7 (812) 552-79-01,

Email: office@iephb.ru,

Сайт: <http://www.iephb.ru/>



Подпись руки *Г.А. Савостьянов*
Подпись *И.А. Честнова*
Печать: *05.10.2016*