

ОТЗЫВ

официального оппонента Шаройко Владимира Владимировича, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии ФГБУ ВО «СПбГУ» **на диссертационную работу Честновой Анны Юрьевны** «Содержание и структура гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени крысы и человека», представляемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 — «Клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Честновой Анны Юрьевны посвящена одному из малоизученных аспектов клеточной биологии гепатоцита, а именно, изменениям динамической структуры гликогена в гепатоцитах печени человека и животных в норме и при циррозе печени, вызванном токсическим и вирусными гепатитами. Изучение закономерностей конформационных изменений супрамолекулярного комплекса «гликоген и ферменты его метаболизма» является чрезвычайно важным для выявления особенностей углеводного обмена в норме и при патологических состояниях организма, включающих поражения печени (циррозы печени вирусной и токсической этиологии), сахарный диабет, наследственные патологии углеводного обмена. Наличие или отсутствие корреляции между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена, а также соотношение про- и макрогликогена в клетках могут служить показателем степени цирротического поражения печени, компенсированности патологического процесса в органе и может использоваться для прогноза заболевания и понимания особенностей патогенеза цирротических изменений печени вирусной и токсической этиологии.

Хронические гепатиты различной этиологии и их финальная стадия — цирроз также относятся к тяжелым и довольно распространенным заболеваниям печени у человека. Цирроз печени и, гепатоцеллюлярная карцинома, как следствие цирроза, входит в число основных причин смертности населения в мире. Известно, что метаболизм глюкозы и гликогена при циррозе печени нарушен, и химизм этих метаболических путей приобретает ряд черт, свойственных сахарному диабету 2 типа. Показано также, что это заболевание характеризуется аккумуляцией гликогена в клетках печени и изменением пространственной структуры его молекулы. Молекулярные механизмы этих структурных изменений остаются невыясненными.

В связи с этим разработанный в диссертационном исследовании Честновой Анны Юрьевны новый методический подход изучения структуры гликогена в отдельных клетках является важным с научной и практической точки зрения. Такой подход

позволяет соотнести изменения в содержании и структуре гликогена в гепатоците с его морфологическими и физиологическими характеристиками в норме и при патологии.

Диссертационное исследование представляет собой завершённый научный труд, направленный на решение актуальных задач в области клеточной биологии, цитологии, гистологии, биохимии и гепатологии.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций

Высокая степень обоснованности и достоверности научных положений, результатов и выводов диссертации объясняются грамотным использованием широкого спектра точных экспериментальных биохимических, цитологических и цитофотометрических методов исследования, корректной статистической обработкой полученных результатов.

Из материалов диссертационного исследования видно, что автор освоил такие экспериментальные методы исследования как приготовление мазков изолированных гепатоцитов, измерение сухой массы, содержания гликогена и ДНК в клетке, определение степени ploидности одноядерных и двоядерных гепатоцитов и другие.

Несомненным достоинством диссертационной работы является разработка метода FRET (Förster Resonance Energy Transfer) для исследования структуры гликогена в отдельных клетках, который включал два этапа: 1) определение кинетики окрашивания гликогена в гепатоцитах с помощью реактивов типа Шиффа, в состав которых входили красители, флуоресцирующие разным цветом, и выбор наилучших условий для выявления прогликогена и макрогликогена в клетках; 2) выбор оптимальных условий для исследования структуры β -частиц гликогена с помощью метода FRET.

Важным преимуществом метода FRET для исследования структуры гликогена в гепатоцитах, по сравнению с другими методами, является возможность определять расстояние между отдельными группами в макромолекуле с точностью, достигающей нескольких нм и неинвазивность, что позволяет исследовать структуру молекул гликогена непосредственно в клетках, сохраняя тем самым интактное молекулярное окружение, в котором находится гликоген и ферменты его метаболизма. В связи с этим, метод представляется крайне информативным и удачно был использован для реализации поставленных автором цели и задач исследования.

Исследования проведены на модели крыс, получавших четыреххлористый углерод для индукции токсического гепатита и цирроза печени, а также на биопсийном материале больных хроническим гепатитом и циррозом печени. Основные задачи

исследования состояли в определении сухой массы гепатоцитов, содержания в них гликогена и ДНК, исследовании взаимосвязи между содержанием гликогена в гепатоцитах различных классов плоидности и их размером в нормальной и цирротической печени при гликогенезе и при рефининге крыс глюкозой, проведении FRET-анализа структуры гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени.

Необходимо отметить, что использованные методические подходы к исследованию содержания и структуры гликогена в гепатоцитах в полной мере соответствуют цели и задачам работы.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

Ряд результатов, полученных при исследовании структуры гликогена в нормальной и цирротической печени крысы и человека, являются приоритетными. Впервые установлено, что содержание гликогена в гепатоцитах нормальной печени зависит от их размера: чем больше клетка, тем более высокое содержание в ней гликогена. При циррозе печени подобная зависимость отсутствует.

Впервые показано, 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. В отличие от крысы, накопление гликогена в гепатоцитах человека в ходе развития цирроза печени происходит, главным образом, за счет увеличения количества β -частиц.

Впервые установлено, что в процессе гликогенеза сухая масса гепатоцитов и содержание в них гликогена, как в нормальной, так и в цирротической печени крысы изменяются пропорционально дозе генов.

С помощью метода FRET впервые показано, что по мере заполнения внешних ярусов β -частиц остатками глюкозы расстояние между ярусами уменьшается.

Диссертационное исследование имеет фундаментальную направленность. Его результаты важны для понимания механизмов нарушения метаболизма гликогена и структуры его молекул при хронических поражениях печени. Наличие или отсутствие зависимости между размером гепатоцитов и содержанием в них гликогена, а также соотношение прогликогена и макрогликогена в клетках могут служить показателем степени поражения печени при циррозе и использоваться для прогноза этого заболевания. Полученные в работе результаты могут быть использованы в курсах лекций и включены в учебно-методические пособия для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских ВУЗов.

Структура работы и ее содержание

Структура диссертации — традиционная. Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста, включает в себя список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы.

Работа иллюстрирована 76 рисунками, содержит 8 таблиц. Список литературы включает 444 научных источников, из которых 78 русскоязычных и 366 на иностранном языке.

Во «Введении» автор диссертации достаточно четко обосновывает причины, побудившие его приступить к данному исследованию, а также его цель и конкретные задачи исследования.

В обзоре литературы (глава 1) автор подробно рассматривает молекулярные аспекты структуры и метаболизма гликогена, а также роль тканевых и клеточных факторов, контролирующих метаболизм и содержание гликогена в печени. Обсуждаются известные нарушения метаболизма гликогена в печени. Описывается принцип метода FRET. Автор делает заключение, что метод FRET не использовался для исследования структуры полисахаридов.

В главе 2 подробно описываются материалы и методы исследования, описание работы с экспериментальными животными, характеристика клинического материала.

В главе 3 приведены результаты исследования, дано их достаточно подробное обсуждение. В диссертации приводятся очень наглядные графики и иллюстрации с подробным описанием, из которых видно, что автором осмыслены данные литературы и собственные экспериментальные результаты.

В заключении автор подводит итог проведенному исследованию, дает оценку возможности применения результатов и обосновывает возможности по совершенствованию экспериментальных подходов по изучению структуры гликогена. Результаты диссертационной работы сформулированы в 7 выводах, которые хорошо аргументированы экспериментальными данными и не вызывают сомнений.

Итоги диссертационного исследования Честновой А.Ю. полностью отражены в 22 научных работах, из них 5 статей опубликовано в журналах из перечня, рекомендованного ВАК РФ. Необходимо подчеркнуть, что результаты исследований неоднократно представлялись на престижных международных и российских конференциях и симпозиумах. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание.

Замечания и вопросы

Следует отметить небольшое замечание к работе.

Было бы желательным привести в главе материалы и методы некоторые клинико-биохимические показатели (активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы, концентрация билирубина) сыворотки крови пациентов с циррозом печени, биоптаты печени которых исследовались. Эти показатели характеризуют степень тяжести нарушения функции печени и в совокупности с измерениями структуры и содержания гликогена в гепатоцитах могли бы дать дополнительную информацию о биохимических нарушениях метаболизма гликогена при циррозе печени.

Совершенно очевидно, что это замечание никак не затрагивает сути диссертационной работы Честновой А.Ю. и совершенно не влияет на хорошее впечатление о рецензируемой работе.

В ходе ознакомления с диссертацией возник ряд вопросов.

1. Как можно объяснить наблюдение того факта, что в гепатоцитах крысы, по мере развития цирроза, расстояние между цепями глюкозных остатков в β -частицах гликогена увеличивается, а в гепатоцитах человека — уменьшается?
2. Что известно из данных литературы относительно структуры и содержания гликогена в гепатоцитах и других клетках организма при сахарном диабете 2 типа?
3. Предположительно может ли отличаться структура гликогена при циррозе печени вирусной и токсической этиологии?
4. Что известно из данных литературы относительно сравнительных профилей экспрессии генов и активности ферментов, контролирующих метаболизм гликогена при циррозе печени и сахарном диабете 2 типа?
5. Изучалась ли структура и содержание гликогена в гепатоцитах в прецирротической стадии? Есть ли доступная информация об этом?

Заключение о соответствии критериям диссертационной работы

По своей актуальности, обоснованности, достоверности, научной новизне, а также высокому методическому уровню диссертационная работа Честновой А.Ю. «Содержание и структура гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени

крысы и человека», в полной мере удовлетворяет требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (п.9. Постановления правительства РФ от 24.09.2013 г., №842 «О порядке присуждения ученых степеней»), а её автор Честнова Анна Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности – 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Доктор биологических наук

Шаройко

Шаройко Владимир Владимирович

199034, г. Санкт-Петербург,
Университетская набережная, 7-9
e-mail: sharoyko@gmail.com
тел.: +7 921 358 21 82
«04» октября 2016 г.

*Подпись руки Шаройко В.В.
завершено
Мачаловым
04.10.2016*



С.В. Воробьева