

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Давыдюка Алексея Викторовича на тему: "Метаболические эффекты динитрозильных комплексов железа в отношении системы крови", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность темы.

Современная медицинская практика опирается на достижения технологий на молекулярном уровне, позволяющих вмешиваться в патологические процессы не только при наличии клинических проявлений, но и на стадии предболезни, при оценке состояния адаптации метаболических процессов изменяющимся условиям жизнедеятельности, экологии и образа жизни.

Возможности ранней диагностики предельного напряжения физиологических, т.н. саногенетических систем *in vitro* методами используются для всё большего числа разнообразных заболеваний.

Так, на протяжении нескольких десятилетий не ослабевает интерес исследователей медико-биологических специальностей к процессам свободнорадикального окисления, особенно в области мембранологии. Многочисленные факты указывают на роль свободных радикалов как важных регуляторов клеточного метаболизма. В то же время неконтролируемое образование свободных радикалов сопровождается многими патологическими процессами и является составной частью патогенеза различных заболеваний. Эти открытия сделали насущной необходимостью разработку методологических подходов к оценке функционального состояния мембранных структур, в зависимости от их биохимического состава, и следует признать, что проблема эта еще не может считаться решенной.

Известно, что молекула монооксида азота (NO), являясь биорадикалом, способна вступать в различные реакции с органическими соединениями и

активными формами кислорода. В результате этого, в зависимости от текущего уровня NO, могут проявляться либо его биорегуляторная активность, либо токсические эффекты, главным образом обусловленные синтезом пероксинитрита.

Напротив, для естественной депонированной формы оксида азота – динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) – в единичных отечественных и зарубежных публикациях, выполненных в модельных биосистемах, описаны антиоксидантные свойства: элиминация субстратов карбонильного, оксидативного и нитрозативного стрессов.

С другой стороны, в настоящее время отсутствуют сведения о сопоставимости и особенностях действия газообразного и депонированного NO на параметры физико-химического гомеостаза крови в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Дефицит научных данных по указанной проблеме и восполняет анализируемая диссертационная работа Давыдюка А.В.

Приведенные сведения позволяют утверждать, что проблема, сформулированная в диссертации, является актуальной, а успешное решение ее позволит предложить инновационные подходы в широком диапазоне научных и прикладных задач изучения аспектов свободнорадикального окисления в медицине и физиологии.

Степень обоснованности и достоверности научных положений

Накопленный автором достаточный объем фактического материала, использование информативных методик исследования полученных данных свидетельствуют о несомненной достоверности проведенного автором исследования. Грамотно и скрупулезно спланированный дизайн исследования полностью вытекают из поставленных задач.

Так, автор достаточно корректно применяет методы свободнорадикальной медицины, прежде всего – анализ Fe-индуцированной

биофлуоресценции для изучения свободнорадикальных процессов в плазме крови и эритроцитах. При этом для комплексного анализа состояния окислительного метаболизма крови автор дополнительно использовал и другие показатели, в частности –концентрацию малонового диальдегида.

Это позволило с единых позиций изучить особенности влияния газообразного и депонированного оксида азота на протекание свободнорадикальных процессов в плазме крови и эритроцитах.

Следует отметить, что дизайн исследования учитывает осведомленность автора в вопросах, связанных с современным состоянием рассматриваемой проблемы и используемыми в настоящее время методологическим и методическим аппаратом.

Основные положения диссертации, выводы и практические рекомендации достоверны и логично вытекают из содержания работы.

Содержание работы и анализ основных положений диссертации.

Во введении дана четкая характеристика диссертационного исследования, которая лаконично обосновывает цель и задачи, выбор дизайна и основные итоги, содержание которых раскрываются в последующих главах диссертации.

В первой главе "Обзор литературы" тщательно и разносторонне анализируются достижения и теоретические положения других авторов о регуляторных свойствах монооксида азота в биологических системах и его убиквитарности. Раскрыты роль и значимость динитрозильных комплексов железа как «рабочей» формы оксида азота у живых организмов, показана структура указанного соединения. С учетом того, что значительная часть диссертации посвящена пока недостаточно хорошо известным биокристаллоскопическим методам исследования, логичным представляется приведение в данной главе краткой характеристики биокристалломики и ее возможностей в исследовании системы крови.

В целом, обзор написан достаточно хорошим языком, основан на критическом анализе значительного количества отечественной и иностранной профильной литературы.

В главе, посвященной описанию материалов и методов исследования, соискателем раскрыт общий объем исследования: 1740 анализов параметров крови от 60 практически здоровых людей и 90 крыс линии Вистар. Приведено подробное описание двухэтапного дизайна проведенного эксперимента, подразделяющегося на фрагменты *in vitro* и *in vivo*.

Для оценки биологических эффектов динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами авторам использован большой комплекс методов, позволяющий провести анализ состояния широкого спектра параметров крови: состояния окислительного и энергетического метаболизма, ферментных систем детоксикации и кристаллогенных свойств сыворотки крови. Представляется интересным подход диссертанта к изучению сопряженности обнаруженных метаболических сдвигов на основании корреляционного анализа.

Особое внимание в главе уделено методике оценки кристаллогенных и иницирующих свойств биологической жидкости, критериям ее описания и трактовке результатов.

Полученные данные обработаны методами вариационной статистики. Для этого использовали лицензионную программу SPSS 16.0.

Изложению результатов собственных изысканий посвящена 3 обширная глава работы, включающая 12 подпунктов, из текста которых можно получить информацию обо всех проведенных автором исследованиях. Данная глава может быть подразделена на два относительно самостоятельных фрагмента. Первый из них основан на комплексном анализе действия свободного (газообразного) и депонированного (в форме динитрозильных комплексов железа – основного тестируемого в работе соединения) оксида азота на параметры изолированных образцов крови. Автором показан дифференцированный характер их влияния на показатели

энергетического обмена (активность лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, уровень лактата и др.), окислительного метаболизма (интенсивность перекисного окисления липидов, общая антиоксидантная активность, перекисная резистентность эритроцитов, концентрация малонового диальдегида), а также кристаллоскопические и тезиграфические фазии сыворотки крови и ряд других физико-химических параметров последней. Важно, что сопоставление произведено с использованием нескольких доз изучаемых форм оксида азота. Направленность и сопряженность ответа на изучаемое воздействие оценивалась автором путем применения корреляционного анализа.

Отдельно следует выделить осуществленное автором рассмотрение особенностей влияния экзогенного оксида азота на каталитические свойства альдегиддегидрогеназы *in vitro*.

Соискателем впервые показано, что указанный фермент, специфично катализирующий высвобождение NO из органических нитратов, также может изменять свою активность под действием сдвига концентрации продукта катализируемой реакции. Эти данные новы как для отечественных, так и для зарубежных специалистов.

Во втором разделе экспериментального исследования диссертантом подробно изучен характер ответа системы крови лабораторных животных (белых крыс линии Вистар) на внутрибрюшинное введение водного раствора глутатион-содержащих динитрозильных комплексов железа.

Изучение производилось с использованием системы показателей, аналогичной экспериментам, выполненным *in vitro*. Показано, что обнаруженные в исследовании на образцах цельной крови тенденции в целом подтверждаются на системном уровне, однако диапазон наиболее физиологически оптимальных дозировок несколько отличается.

При **обсуждении** полученных результатов, автор широко использует современные знания о молекулярных патобиохимических механизмах изучаемых явлений. Так, согласованность изменений отдельных

метаболических параметров крови, как и в отношении экспериментов *in vitro*, верифицирована автором путем использования корреляционного анализа.

Обоснованность результатов, полученных автором, подтверждается согласованными с ними выводами, количественно и качественно раскрывающими сформулированные задачи.

Список использованной литературы, пронумерованный в алфавитном порядке, содержит 177 наименований источников, среди которых 67 принадлежат иностранным авторам.

Научная новизна основных выводов и результатов работы.

Научная новизна работы определяется комплексным характером, выполненного исследования показателей свободнорадикальных процессов. Так, важно отметить, что анализ состояния окислительного метаболизма сочетается в рассматриваемой работе с контролем параметров энергетического обмена, ферментных систем детоксикации.

В качестве новых научных результатов диссертантом выдвинуты положения об особенностях биологических эффектов глутатионовых динитрозильных комплексов железа в отношении системы крови. Соискателем убедительно доказано, что в условиях *in vitro* и *in vivo* введение данного донора оксида азота приводит к смещению ряда параметров энергетического и окислительного метаболизма, состояния детоксикационных систем эритроцитов, а также кристаллогенных свойств крови.

Показано, что выраженность сдвигов изучаемых метаболических и физико-химических показателей крови определяется действующей дозой динитрозильных комплексов железа, причем ценным является то, что автором выделены биологически оптимальные дозы данного агента.

Установлено наличие взаимосвязи между метаболическими и кристаллоскопическими параметрами в процессе ответа на применение

физиологического донора оксида азота. Это дало возможность автору предложить схему ответа биосистемы на введение в биосистему глутатион-содержащих динитрозильных комплексов железа.

Существенным и инновационным блоком в работе являются биокристаллоскопические исследования, которые позволяют соискателю с интегративных позиций оценить действие оксида азота, в том числе – в форме динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами, на физико-химические свойства жидкой части крови.

Иначе говоря, диссертантом адекватно применены современные биофизические и биохимические методы для решения физиологических задач, связанных с изучением эффектов динитрозильных комплексов железа на биосистемном (образцы крови) и организменном уровнях.

Основные результаты диссертации опубликованы в 26 печатных работах (2013-2017 гг.), причем 8 из которых – статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Практическая значимость работы.

Результаты, полученные при изучении свободнорадикальных процессов, их глубокое осмысление и адекватный статистический анализ полученных данных, позволили диссертанту сформулировать соответствующие выводы и дать конкретные практические рекомендации.

Таким образом, результаты, полученные автором, являются новым научным достижением в физиологии системы крови и свободнорадикальной медицине, создающим базис для развития существующих и формирования новых биомедицинских технологий.

В целом, изучение материалов выполненного исследования, оставляет весьма благоприятное впечатление и свидетельствует о вдумчивом подходе автора к интерпретации собственных результатов и высокой эрудиции по обсуждаемым проблемам.

Диссертация и автореферат написаны доступным литературным языком. Диссертационная работа заслуживает положительной оценки. Принципиальных замечаний к работе нет. В порядке научной дискуссии, предлагаю автору при публичной защите, дополнительно осветить следующие **вопросы**:

1. На какие особенности структурообразования биологической жидкости оказывает влияние изменение уровня оксида азота?

2. За счет чего может осуществляться действие монооксида азота на детоксикационные ферменты, в частности, на изучаемую в диссертации альдегиддегидрогеназу?

3. Каким образом могут быть применены результаты Вашего исследования в практической медицине?

Следует отметить, что текст диссертации и автореферата содержат ряд орфографических и пунктуационных ошибки, однако необходимо признать, что отмеченные замечания не снижают качество исследований, не влияют на главные теоретические выводы и практические результаты.

Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Заключение.

Кандидатская диссертация Давыдюка Алексея Викторовича "Метаболические эффекты динитрозильных комплексов железа в отношении системы крови" представляет собой законченный научно-исследовательский труд, выполненный автором самостоятельно на высоком научном уровне, и является научной квалификационной работой, в которой содержатся существенные новые данные о свободнорадикальных процессах в крови при физиологических и патофизиологических явлениях.

Работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от

21.04.2016 и №748 от 02.08.2016г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Давыдюк Алексей Викторович заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.03.01 – физиология.

Заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, директор Научно-методического Центра по молекулярной медицине МЗ РФ, главный специалист-эксперт Росздравнадзора по клинической лабораторной диагностике по Северо-Западному Федеральному округу, академик метрологической академии, д.м.н., профессор



Владимир Леонидович Эмануэль

тел. (812) 338 67 22

e-mail: vladimirem1@gmail.com

адрес: 197022г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Подпись руки заверяю: Эмануэль В. Л.
Вед. документооборот: А.А.Янькова Янькова
«05» 03 2018г.