



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376
тел.: +7 (812) 234-6868; факс: +7 (812) 234-9489; e-mail: iem@iemspb.ru; https://iemspb.ru

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора

ФГБНУ «Институт экспериментальной
медицины» по научной работе

д.б.н., доцент

Шамова / О.В. Шамова

2019 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» о научно-практической значимости диссертации МАРТУСЕВИЧ Анастасии Анатольевны «Метаболические и гемодинамические эффекты синглетного кислорода», представленной к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы выполненной работы и её связь с соответствующими отраслями науки.

Активные формы кислорода (АФК), наряду с активными формами азота, галогенов и карбонильными соединениями, участвуют в регуляции физиологических процессов, в том числе выполняют функции «вторичных мессенджеров», а при определенных условиях перечисленные классы соединений принимают участие в развитии свободно-радикальных патологических процессов, объединяемых термином окислительный (оксидативный) стресс. Окислительный стресс рассматривается как одна из

причин отягощающих воспаление и ускоряющих процесс старения. Среди АФК, супероксид-анионный радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал, озон, одним из наименее стабильных и наименее изученных соединений является синглетный кислород (${}^1\text{O}_2$). Диссертационная работа Анастасии Анатольевны Мартусевич посвящена фундаментальной проблеме: исследованию биохимических и физиологических эффектов ${}^1\text{O}_2$ на процессы обмена и гемодинамики в системах *in vitro* и *in vivo*. Следует отметить, что до выполнения данной работы в мировой литературе практически отсутствовали систематические описания влияния ${}^1\text{O}_2$ на образцы донорской крови и ткани животных, подвергавшихся, барботажу и курсам ингаляций газовой смесью, содержащей ${}^1\text{O}_2$, соответственно. Известно о медицинском применении пероксида водорода и озона, а синглетный кислород практически не изучен в данном аспекте. Практически ничего не было известно о взаимодействии ${}^1\text{O}_2$ с системой антиоксидантной защиты организма, которая включает ферментативные и неферментативные антиоксиданты. В работе Анастасии Анатольевны Мартусевич впервые проведен анализ наличия у синглетного кислорода антиоксидантной активности. Учитывая, что традиционно АФК рассматриваются прежде всего, как потенциально опасные для биологических систем агенты, актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений.

Связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Полученные результаты позволяют обосновать выполнение доклинических исследований применения газовой смеси, содержащей синглетный кислород. Диссертационная работа связана с приоритетными направлениями научно-технологического развития и ответом на «большие вызовы», в том числе пункт 20 «Стратегии научно-технологического развития Российской

Федерации»: переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных).

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна выполненных исследований заключается в систематическом анализе обменных и гемодинамических эффектов $^{1}\text{O}_2$. Важным преимуществом работы является то, что в большинстве экспериментов помимо газовой смеси, содержащей $^{1}\text{O}_2$, использовались смеси, содержащие медицинский озон либо кислород. Более того примененный в работе генератор $^{1}\text{O}_2$ позволял работать в двух режимах мощности (50 и 100%), что обеспечило возможность анализа зависимости эффектов от дозы агента. Описанные подходы позволили автору корректно интерпретировать полученные результаты. В частности, в диссертационной работе впервые показано, что при обработке газовым потоком, получаемым от генератора $^{1}\text{O}_2$, образцов донорской крови (условия *in vitro*) и группы здоровых крыс (условия *in vivo*), наблюдаются антиоксидантные эффекты и стимуляция энергетического обмена клеток и тканей. Помимо этого впервые показано увеличение активности ферментов, участвующих в защите клеток от стрессорных факторов, стимуляция кристаллогенных свойств сыворотки крови, изменение электрофоретической подвижности эритроцитов. Полученные автором данные могут быть использованы при преподавании курсов биохимии и физиологии в ВУЗах биологического и медицинского профиля: Московский Государственный Университет им. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9; Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8; Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова,

Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов.

Полученные соискателем результаты важны для физиологии и биохимии, поскольку позволяют сформировать представления о характере системного ответа на ингаляционное применение газового потока, исходно содержащего $^{1}\text{O}_2$. Они имеют существенное значение для разработки новых медицинских технологий, ориентированных на коррекцию окислительного стресса, как общего звена ряда патологических процессов. Обнаруженный соискателем саногенетический эффект обусловлен положительным действием газового потока с $^{1}\text{O}_2$ на гемодинамические и метаболические параметры.

Структура и содержание работы.

Рассматриваемая диссертация построена по классическому плану и состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Материал и методы исследования, Результаты собственных исследований, Заключение, завершающееся выводами. Объем диссертации составляет 167 страниц машинописного текста, список цитированной литературы включает 167 тематических источников, в том числе 84 русскоязычных и 83 – на иностранных языках. Результаты диссертационного исследования проиллюстрированы 45 рисунками и одной таблицей.

Соискателем поставлена цель исследования: комплексная оценка биологических эффектов синглетного кислорода, которая достигается решением четырех задач, выделяющих основные этапы выполненной соискателем работы. Задачи успешно решаются с помощью проведенных автором работы экспериментов, выполненных в контролируемых условиях. Экспериментальные результаты получены с использованием большого числа образцов крови (суммарно – 2390), полученных от 60 крыс линии Вистар и от 50 практически здоровых доноров. Опыты выполнены с соблюдением этических норм гуманного обращения с лабораторными животными,

добровольцы были проинформированы о цели исследования.

Для исследования эффектов газового потока, содержащего $^{1}\text{O}_2$, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* соискателем использован широкий спектр биохимических и биофизических методов, а также технологии функциональной диагностики. Для анализа антиоксидантной активности и параметров окислительного стресса автором была использована индуцированная ионами железа хемилюминесценция, определена концентрация продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, а также ферментативная активность супероксиддисмутазы. Для анализа состояния энергетического обмена определялась активность лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, концентрация лактата. Кроме того, определялись физико-химические свойства крови (рН, парциальное давление газов и др.). В качестве интегральных характеристик воздействия $^{1}\text{O}_2$ на эритроциты была охарактеризована их электрофоретическая подвижность, а в случае сыворотки крови была использован кристаллоскопический метод.

Для всех количественных и полукачественных результатов использованы статистические методы проверки справедливости нулевой гипотезы с помощью параметрических и непараметрических критериев.

Глава, посвященная описанию собственных результатов исследования, логично разделена на два фрагмента: опыты с барбатированной донорской кровью и исследования на крысах, повержшихся курсу ингаляций газовой смесью, содержавшей $^{1}\text{O}_2$. В рамках первой части проведено сравнение влияния низкой концентрации озона и двух режимов генерации $^{1}\text{O}_2$ на физико-химические показатели крови при воздействии данных факторов *in vitro*. Показано, что озон выступает в качестве умеренного прооксидантного агента, незначительно стимулирует промежуточные этапы энергетического метаболизма и угнетает кристаллогенную активность сыворотки крови и электрофоретическую подвижность эритроцитов. Напротив, воздействие $^{1}\text{O}_2$, в первую очередь при использовании полной мощности генератора, обладает эффектами стимуляции антиоксидантной системы и энергетического обмена,

одновременно способствуя активации кристаллогенной активности сыворотки крови и подвижности эритроцитов в электрическом поле. В рамках второй части приведены сведения о сравнительном характере ответа метаболизма крови и тканей, а также системной и локальной гемодинамики крыс линии Вистар на проведение краткого (10 процедур) курса ингаляций газовой смесью, содержащей $^1\text{O}_2$. Автором продемонстрировано действие на все рассматриваемые физиологические и биохимические показатели, причем наиболее значимый эффект был получен при применении полной мощности устройства, генерирующего $^1\text{O}_2$. В этом случае происходило повышение антиоксидантного потенциала плазмы крови и тканей, а также стимуляция энергетического метаболизма.

Выводы, приведенные в конце раздела Заключение, четко сформулированы, вполне обоснованы и подкреплены фактическими данными диссертационного исследования, качественно и количественно соответствуют поставленной цели и задачам работы.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, основываются на большом объёме экспериментальной работы, хорошо аргументированы и логически обоснованы. При выполнении работы были использованы современные информативные биохимические, биофизические и физиологические методы исследования. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. Полученные данные обработаны в соответствии с общепринятыми методами статистики, что позволяет считать результаты достоверными. Поставленные задачи решены полностью.

Личное участие соискателя в подготовке диссертации.

Диссидентом Анастасией Анатольевной Мартусевич под руководством д.б.н., доцента Анны Вячеславовны Дерюгиной и при консультировании д.м.н., проф. Сергея Петровича Перетягина был собран материал, на

основании которого выполнена диссертационная работа, проведены эксперименты и последующая статистическая обработка данных, а также анализ полученных результатов, подготовлены научные публикации. Основные результаты диссертации представлены в 52 научных работах, в том числе 2 монографиях, 31 статье в журналах, рекомендованных ВАК РФ (12 из них – в изданиях, индексируемых международными базами цитирования WOS и Scopus). Полученные результаты прошли апробацию и обсуждены на всероссийских и международных научно-практических конференциях физиологического и биохимического профиля. В большинстве публикаций А.А. Мартусевич является лидирующим автором.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

В процессе выполнения работы диссидентом получены новые данные об особенностях влияния на биологические системы экзогенного $^{1}\text{O}_2$. Показано его положительное влияние на метаболические и гемодинамические параметры организма крысы. Несомненно, следует продолжить исследования по вопросам, разработанным в данной работе, так как созданная фундаментальная база способна служить основой для разработки инновационных технологий метаболической коррекции, в частности, в экспериментальной и клинической комбустиологии, медицине критических состояний и др. Полученные автором диссертации результаты и выводы целесообразно использовать в исследовательской работе научных коллективов, занимающихся изучением свободнорадикальных процессов, таких как Лаборатория биохимии свободно-радикальных процессов, Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а, руководитель – д.б.н., профессор Ланкин Вадим Зиновьевич; Лаборатория нейрохимии и обмена веществ, Кафедра биохимии, Биологический факультет, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9, руководитель – д.б.н., профессор Ещенко Наталия Дмитриевна; Лаборатория молекулярных

механизмов свободнорадикальных процессов, ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной медицины», Новосибирск, ул. Тимакова, 2, руководитель – д.м.н. Меньщикова Елена Брониславовна.

Замечания к работе.

Принципиальных замечаний к диссертации нет.

Несмотря на высокую оценку диссертации, при внимательном прочтении текста был обнаружен ряд стилистических недочетов, лабораторный жаргон, многие введенные сокращения отсутствуют в общем списке и часто не используются в тексте, обзор литературы мог бы содержать большее количество ссылок на конкретные источники (на стр. 11-21 нет ни одной ссылки), встречаются ошибки в химических реакциях (например, в реакции Фентона на стр. 11), на некоторых рисунках подписи осей не соответствуют названиям рисунков (Рис. 34, 36-39, 41-44).

В рамках дискуссии хотелось бы узнать мнение автора по следующим вопросам:

1. Какие молекулярные механизмы могут обуславливать специфические изменения активности супероксидимутазы, лактатдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы при воздействии $^1\text{O}_2$ на донорскую кровь?
2. При интерпретации данных на рисунке 29 автор приписывает озону гипоксические свойства. Как это относится с проокисидантными свойствами озона, доказанными в работе?
3. Как автор объясняет увеличение активности альдегиддегидрогеназы эритроцитов *in vivo* при действии $^1\text{O}_2$, но не озона, принимая во внимание, что в опытах *in vitro* активность фермента возрастала как при действии кислорода, так и озона, и $^1\text{O}_2$?

Однако высказанные замечания не умаляют значения и актуальности диссертационного исследования, а вопросы носят дискуссионный характер.

Заключение.

Диссертация Мартусевич Анастасии Анатольевны на тему «Метаболические и гемодинамические эффекты синглетного кислорода»,

представленная к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.04 – биохимия, является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным самостоятельно, на достаточно высоком научном и методическом уровне и направленным на решение актуальной научно-практической задачи в физиологии и биохимии биологически активных соединений – определению биологически активных свойств синглетного кислорода и других активных форм кислорода.

По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор достойна присуждения искомой степени по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.04 – биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Отдела молекулярной генетики и лаборатории биохимической генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», протокол заседания №2 от 17 апреля 2019 года.

Заведующий лабораторией биохимической генетики
Отдела молекулярной генетики
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
д.б.н.

Алексей Викторович Соколов

13 мая 2019 г.

Почтовый адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12,
ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины"
рабочий телефон: +7(812) 234-56-06;
Эл. почта: biochemsokolov@gmail.com

Подпись Соколова А.В.
Удостоверяется
Специалист по кадрам ФГБНУ «ИЭМ»

