

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, руководителя лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов ФИЦ ФТМ Меньшиковой Елены Брониславовны, на диссертационную работу Иванова Владимира Евгеньевича «Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения», представленную к защите в диссертационный совет 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика

Актуальность темы диссертации

Активированные кислородные метаболиты (АКМ; прооксиданты) непрерывно генерируются *in vivo* и играют двойную роль – выступают в качестве либо физиологического сигнального мессенджера (эустресс), либо повреждающего фактора (дистресс, наиболее часто называемый окислительным стрессом). Прооксиданты, синтезирующиеся регулируемым и контролируемым образом, избирательно реагируют с биологическими молекулами, давая начало специфическим продуктам и дирижируя сигнальными каскадами, в то время как их гиперпродукция запускает нерегулируемое окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот, приводя к развитию окислительного стресса и внося весомый вклад в возникновение и прогрессирование множества патологических процессов и заболеваний. При этом зачастую невозможно достоверно установить причинно-следственную связь и последовательность событий, лежащих в основе этиопатогенеза заболевания: привел ли к этому некий сбой в сложной системе взаимоотношений между прооксидантами и антиоксидантами или нарушены тонкие механизмы физиологической регуляторной функции АКМ (в том числе в силу вмешательства в контроль за их генерацией).

Белки представляют собой важную мишень для АКМ и для продуктов окисления ими липидов и углеводов вследствие высокой скорости реакции с прооксидантами и повсеместного присутствия в клетках, внеклеточных тканях и жидкостях организма. Наименее изучены, но в то же время заслуживают большего внимания стабильные редокс-активные модификации белков, поскольку они являются наиболее вероятными кандидатами на роль, с одной стороны,

прямых или косвенных участников в физиологических сигнальных механизмах, а с другой – биомаркеров окислительного повреждения.

В этой связи очевидна актуальность диссертационного исследования В.Е. Иванова, помогающего восполнить пробелы в изучении механизмов и собственно феноменологии генерации долгоживущих активных форм белков (ДАФБ) под действием тепла и лазерного излучения видимого диапазона, последствий этого процесса, в том числе в виде вторичной продукции АКМ, окислительного повреждения ДНК *in vitro* и изменений *in vivo*.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформой, четкостью и последовательностью изложения, взаимосвязью и обоснованностью сформулированных в ней научных положений, выводов и поставленных задач. Тема работы в достаточной степени отражена в цели исследования, достичь которую позволяет поэтапное решение задач. При этом следует отметить, что использованные в работе методические подходы и методики позволяют в полной мере решить поставленные задачи и сформулировать выводы. Обработка первичного материала проводилась с применением адекватных статистических методов, что позволило автору корректно интерпретировать полученные результаты исследований. Положения, выносимые на защиту, и выводы, сформулированные в диссертации, основаны на представленном фактическом материале и являются непосредственным итогом научной работы, проведенной автором. Таким образом, можно говорить о высокой степени обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Научная новизна основных выводов и результатов

Научная новизна диссертационной работы Иванова В.Е. соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Впервые обнаружено, что воздействие излучения гелий-неонового лазера (с длиной волны 632,8 нм, соответствующей основной линии поглощения

молекулярного кислорода в видимой области спектра) и умеренного нагревания (45 °С) сопровождается образованием ДАФБ в сыворотке крови и модельных растворах белков (бычьего сывороточного альбумина и гамма-глобулина, желатина, нативного и гидролизованного казеина).

Исследование генерации низкомолекулярных АКМ в сыворотке крови и модельных растворах белков – как прямое, в случае анализа продукции пероксида водорода и гидроксильного радикала, так и опосредованное (ингибиторный анализ, использование D₂O), при определении синтеза синглетного кислорода и супероксидного анион-радикала, позволило установить, что используемые воздействия сопровождаются продукцией широкого спектра АКМ, как доказывает автор – вторичной, опосредованной индукцией ДАФБ. Однонаправленность изменений в разных модельных системах убедительно доказывает генерацию перечисленных видов АКМ и постулируемые автором утверждения. Полученный интересный эффект продолжительного персистирования H₂O₂ при воздействии лазерного излучения и тепла позволил обоснованно предложить возможный механизм позитивного эффекта используемых в медицине физиотерапевтических процедур, поскольку пероксид водорода – одно из наиболее значимых, наряду с оксидом азота и сульфидом водорода, стабильных редокс-активных низкомолекулярных соединений, участвующих во внутри- и межклеточном сигналинге.

В работе впервые показано, что, с одной стороны, ДАФБ, образующиеся в сыворотке крови под воздействием гелий-неонового лазера и гипертермии, способны индуцировать окислительное повреждение ДНК в бесклеточной модельной системе *in vitro*, а с другой – оказывать протективный эффект *in vivo*, способствуя уменьшению количества микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей, подвергнутых действию ионизирующей радиации.

Достоверность полученных результатов. Оценка содержания диссертации, её завершённости, замечания по оформлению работы

Диссертационная работа Иванова В.Е. имеет чёткую логическую последовательность и дизайн. Цели и задачи соответствуют теме диссертации; выводы и положения, выносимые на защиту, следуют из полученных результатов исследования. Достоверность полученных результатов доказывается большим объемом исследованного материала, использованием современного сертифицированного оборудования и корректной статистической обработкой полученных данных.

Диссертация Иванова В.Е. написана по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, список использованных сокращений, список цитируемой литературы (297 источников). Диссертация изложена на 159 страницах, содержит 7 таблиц и 22 рисунка. При её выполнении использован комплекс современных, информативных, хорошо зарекомендовавших себя и широко используемых методов, соответствующих цели и задачам исследования. В целом диссертационная работа соответствует критерию внутреннего единства.

В главе «Введение» диссертант раскрывает актуальность темы диссертационного исследования, степень её разработанности, формулирует цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, описывает методологию и методы исследования, степень достоверности и апробацию результатов, обозначает публикации по исследуемой теме.

Глава «Обзор литературы» включает в себя три подглавы, раскрывающие сведения об окислении белков, в том числе приводящем к образованию их долгоживущих радикалов и гидропероксидов; об источниках генерации пероксида водорода в живых системах и его участии как вторичного посредника в регуляторных процессах; о влиянии видимого света на физиологические и патологические реакции макроорганизмов, возможностях его диагностического и терапевтического применения.

В главе «Материалы и методы» приведено подробное описание методов моделирования воздействия тепла и оптического электромагнитного излучения. Для анализа процессов образования ДАФБ и АФК в растворах сыворотки и белков применялись современные хемилюминесцентные, флуоресцентные, иммуноферментные методы, оценку вторичных генотоксических повреждений выполняли с помощью микроядерного теста. Дизайн исследования хорошо продуман, логично построен и последовательно изложен. Достоверность результатов исследования определяется количеством и качеством материала, полученного в ходе экспериментального исследования и проанализированного с использованием адекватных методов статистической обработки.

Глава «Результаты» имеет 3 подраздела, описывающие основные результаты диссертационного исследования Иванова В.Е., отраженные в таблицах и рисунках. Первый подраздел включает в себя данные об образовании ДАФБ под действием тепла и оптического электромагнитного излучения; установлено, что во всех модельных системах образуются ДАФБ, время полужизни которых составляет 4–5 ч. Во втором подразделе, посвященном анализу генерации АКМ под действием ДАФБ, приводятся прямые доказательства продукции пероксида водорода, ОН-радикала и косвенные – синтеза $O_2^{\bullet-}$ и 1O_2 . В третьем подразделе описан эффект ДАФБ, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением – генотоксический в модельной системе *in vitro* и защитный при облучении мышей *in vivo*.

В главе «Обсуждение» полученные результаты обобщены, дана оценка данным. Следует отметить, что данный раздел отличается ясностью изложения, тщательный анализ полученных результатов, а не их пересказ, как это нередко бывает, и свидетельствует о прекрасном понимании автором сути своей работы. В конце главы «Заключение», которая подытоживает диссертационное исследование, автор формулирует свое представление о молекулярных механизмах используемых в медицинской практике излучения гелий-неонового лазера и умеренной гипертермии, обоснованно предполагая участие в них ДАФБ и вторично образующегося пероксида водорода, который вызывает стимуляцию защитных и репарационных систем в клетках организма. При этом двойственность их действия, в том числе выявленная в диссертационном исследовании, позволила Иванову В.Е. подчеркнуть необходимость продолжения изучения влияния данных воздействий на биологические системы.

В целом можно сказать, что в результате проведенного диссертационного исследования цель работы достигнута. Выводы научно обоснованы, соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Библиографический список использованных литературных источников составлен корректно, однако хотелось бы видеть в нем больше современных источников (приведено только 46 ссылок на работы последних 5 лет, за 2020 и 2021 г. нет ни одного источника).

Автореферат диссертации Иванова В.Е. выполнен в соответствии с требованиями ВАК, содержит все необходимые разделы, материал адаптирован к восприятию и отражает защищаемые положения диссертации. Апробация

результатов диссертационного исследования проведена на достаточно высоком уровне, о чём свидетельствуют доклады по материалам диссертации на научных форумах федерального и международного уровня.

По материалам диссертации опубликовано 10 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации диссертационных материалов.

Замечания по оформлению работы, вопросы

В целом работа написана грамотно, хорошим языком, но встречаются отдельные несуразности. Так, уже в названии работы допущена опечатка («электромагнитного»). Стр. 35: «селеноцистеин-зависимый фермент глутатионпероксидаза» (правильно – селеноцистеин-содержащий). Стр. 37 «весовые доказательства» (видимо, «весомые»). Стр. 49: «Системы защиты ферментов от АФК»: во-первых, очевидно, имеются в виду ферментативные системы защиты от АФК, во-вторых, они не ограничиваются указанными автором; последнее справедливо и для перечисления на стр. 50 неферментативных антиоксидантов. Стр. 51: «аутофагию, которая является процессом деградации лизосом»: фраза построена таким образом, что создается неверное представление о сути аутофагии. Стр. 55: « H_2O_2 высвобождается НАДФН-оксидазой 2 фагоцитов» (Nox2 синтезирует исключительно супероксид-анион). Стр. 61: «интерферона γ и интерлейкина β » (интерферона γ и интерлейкина β).

Некоторая небрежность при чтении англоязычных источников сыграла с автором злую шутку, приведя к появлению в работе (обзоре литературы) неприемлемых лексических конструкций. Иногда, чтобы понять смысл написанного, приходится переводить фразу с русского на английский: «аскорбат является эффективным гидропероксидным восстановителем» (стр. 33); «бутилированный гидрокситолуол» (стр. 34); «пероксиредоксины 2 и 3, которые являются богатыми Cys-содержащими ферментами (стр. 36); «экстенсивная модификация» (стр. 40); «гипероксидирование R-SOH» (стр. 49); «пероксидатический путь» (стр. 49); «разрыв цепи переноса электронов» (стр. 52); «полученные из DUOX градиенты H_2O_2 » (стр. 54); «TrxR1 взаимодействует с Keap1 в обнаружении окислительного стресса» (стр. 58).

При описании результатов экспериментов, выполненных с использованием растворов сыворотки, целесообразно каждый раз указывать ее разведение, а не ограничиваться первоначальным указанием, что для дальнейших опытов

использовано разведение 1/200 (стр. 75). Например, фраза «Установлено, что при наличии тяжелой воды в растворе время жизни $^1\text{O}_2$ возрастает» повторяется 4 раза.

Вопросы для дискуссии:

1. На чем основано утверждение, что именно ДАФБ, а не другие компоненты сыворотки крови индуцируют генерацию АКМ? Например, в разделе «Обсуждение» указано, что при воздействии гипертермии АКМ образуются даже в водных растворах.

2. Недостаточно хорошо представлен раздел, посвящённый экспериментам *in vivo*. Из раздела «Материал и методы» практически невозможно понять дизайн эксперимента. Некоторую ясность вносит описание полученных результатов, но вопросы остаются. Мыши каких линий, какого пола и возраста использованы, какова численность групп?

3. Как Вы предполагаете, каким образом индуцированная теплом и светом окислительная модификация регуляторных белков может влиять на их функцию? Так, известно, что именно окисление белков редокс-зависимых сигнальных систем (например, ингибитор Keap1 транскрипционного фактора Nrf2) приводит к их активации.

Высказанные замечания носят дискуссионный и рекомендательный характер и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Диссертационная работа Иванова Владимира Евгеньевича «Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения» является оригинальной, законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи анализа механизмов реализации эффекта лазерного излучения видимого диапазона и нагревания на биологические системы, имеющей значение для развития биофизики. Диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Иванов Владимир Евгеньевич, заслуживает

присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Официальный оппонент

Меньщикова Елена Брониславовна

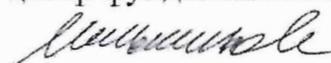
доктор медицинских наук, руководитель лаборатории

молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов

Федерального государственного научного бюджетного учреждения

«Федеральный исследовательский центр фундаментальной

и трансляционной медицины»



Е.Б. Меньщикова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ)

Адрес: г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2,

Тел: +7-383-333-65-37, +7-383-335-97-74

Электронная почта: director@frcftm.ru

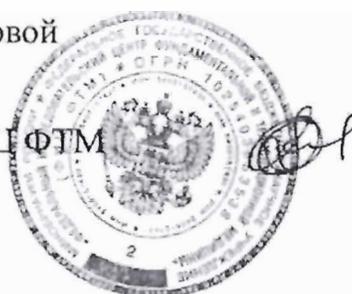
Сайт: <https://frcftm.ru>

Подпись

д-ра мед. наук Е.Б. Меньщиковой

заверяю

начальник отдела кадров ФИЦ ФТМ



О.М. Минеева

10 января 2022 г.