

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.340.06, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 10.02.2022 г. № 1

О присуждении Иванову Владимиру Евгеньевичу, гражданину России, ученой
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Образование долгоживущих активных форм белков под действием
тепла и оптического электромагнитного излучения» по специальности **1.5.2 – биофизика**
принята к защите 07.10.2021 г., протокол № 10, диссертационным советом 24.2.340.06,
созданным на базе федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего
образования Российской Федерации (603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
приказ Минобрнауки РФ от 14 октября 2016 года № 1256/нк).

Соискатель, Иванов Владимир Евгеньевич, 1988 года рождения, в 2010 г. закончил
ННГУ им. Н.И. Лобачевского по специальности «Биология».

В период с 2010 г. по 2013 г. обучался в очной аспирантуре Института
теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН)
по специальности «Биофизика».

В период подготовки диссертации соискатель Иванов В.Е. работал младшим
научным сотрудником в Центре биофотоники ИОФ РАН.

Диссертация Иванова Владимира Евгеньевича «Образование долгоживущих
активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения»
прошла апробацию в лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН и в Центре
биофотоники ИОФ РАН, была рекомендована к защите на заседании Ученого совета
Центра биофотоники ИОФ РАН 8 июля 2021 г., на заседании секции «Биомедицина»
Ученого совета ИТЭБ РАН – 21 июля 2021 г.

Научный руководитель – **Гудков Сергей Владимирович** - доктор биологических наук, доцент, руководитель центра биофотоники Федерального исследовательского центра «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Меньщикова Елена Брониславовна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов (г. Новосибирск),

Соколов Алексей Викторович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», заведующий лабораторией биохимической генетики Отдела молекулярной генетики (г. Санкт-Петербург)

дали положительные отзывы на диссертацию.

В положительном отзыве официального оппонента д.м.н., **Меньщиковой Елены Брониславовны** отмечено, что диссертационная работа Иванова В.Е. «Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения» посвящена актуальной теме изучения 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 активированных кислородных метаболитов (АКМ), окислительного повреждения ДНК *in vitro* и изменений *in vivo*. 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 °C) 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.

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, посвященный 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.

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, имеющие значение для развития биофизики. Диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Иванов Владимир Евгеньевич, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

В положительном отзыве официального оппонента д.б.н., **Соколова Алексея Викторовича** отмечено, что диссертация Иванова В.Е. «Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения» направлена на изучение возможности образования долгоживущих активных форм белков под действием низкоинтенсивных излучений. В настоящем диссертационном исследовании под долгоживущими активными формами белков (ДАФБ) следует понимать локализованные на белках гидроперекиси и долгоживущие радикалы, образующиеся под действием излучений и генерируемых ими окислителей, в том числе пероксида водорода. Способность ДАФБ истощать запасы антиоксидантов, вызвать мутации и опухолевую трансформацию клеток обуславливает пристальное внимание исследователей к механизмам образования таких форм белков. Учитывая распространенность разнообразных тепловых и электромагнитных излучений, в том числе используемых при физиотерапевтических процедурах, избранная Владимиром Евгеньевичем Ивановым тема диссертационного исследования представляется актуальной. Расшифровка механизмов образования и действия на биологические процессы ДАФБ имеет как фундаментальное и

практическое значение. Для исследования возможности генерации ДАФБ была использована разбавленная сыворотка крови, которая помимо белков содержит и антиоксиданты. Установлено, что образование ДАФБ в этом случае зависело от степени разбавления сыворотки, температуры и времени воздействия. Время полужизни радикалов, образующихся на белках сыворотки, было определено как 3-4 часа после воздействия. Помимо альбумина был использован также препарат гамма-глобулина сыворотки крови быка, для обоих белков была установлена линейная зависимость генерации ДАФБ от времени лазерного воздействия, а также период полужизни ДАФБ - 4-5 часов. Сходные результаты были получены в случае обработки белковых растворов тепловым воздействием, выход ДАФБ увеличивался при увеличении температуры и концентрации кислорода. Наконец, было изучено образование ДАФБ при воздействии излучений на гидролизат казеина, в котором этот процесс шел эффективнее по сравнению с казеином. Логичным продолжением исследования было измерение концентрации АФК, а именно пероксида водорода и гидроксильных радикалов при обработке белков тепловым и оптическим электромагнитным излучениями. Было установлено, что генерация АФК зависит от времени воздействия и характеризуется оптимумом концентрации белков. В случае теплового воздействия достигались концентрации около 40 нМ пероксида водорода, а в случае лазерного излучения - около 12 нМ. Ингибиторный анализ показал, что в генерации АФК участвует кислород, в том числе синглетный, а также гидроксильные и супероксидные радикалы. Завершает раздел «Результаты» сравнение генотоксических эффектов ДАФБ с рентгеновским излучением. Для этого были применены адекватные методы - твердофазного иммуноферментного анализа 8-оксогуанина в ДНК и микроядерный тест. Заслуживает внимания выявленный с помощью микроядерного теста адаптивный эффект введения мышам сыворотки, подвергнутой лазерному либо тепловому воздействию, с последующим облучением мышей дозой 1 Гр.

Замечания и вопросы:

По результатам знакомства с диссертационной работой не возникло каких-либо существенных замечаний по сути изложения результатов и интерпретации полученных данных. В порядке дискуссии хотелось бы узнать мнение диссертанта по следующему вопросу: учитывая, что помимо АФК, в иммунных реакциях принимают участие активные формы галогенов, в том числе хлорноватистая кислота, возможно ли, по мнению диссертанта, участие галогенов в образовании ДАФБ, и будут ли принципиально отличаться по генерации АФК белки с гемовыми простетическими группами?

Данный вопрос носит дискуссионный характер и не снижает высокой оценки работы.

Диссертационная работа Иванова Владимира Евгеньевича «Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика, является завершенной научно-квалификационной работой, которая решает актуальную научную задачу исследования возможности и механизмов образования долгоживущих активных форм белков и активных форм кислорода под действием теплового и оптического облучения. По актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов настоящая работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Иванов Владимир Евгеньевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Ведущая организация: Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (г. Пушкино) в своем положительном отзыве, подписанном **Новиковым Вадимом Викторовичем** д.б.н., ведущим научным сотрудником Лаборатории механизмов рецепции ИБК РАН и утвержденным **Моренковым Олегом Сергеевичем**, д.б.н., директором ИБК РАН, **указала**, что диссертационная работа Иванова В.Е. «Образование долгоживущих активных форм белков под действием тепла и оптического электромагнитного излучения», является законченной научно-квалификационной работой. В ходе выполнения работы раскрыты принципы и закономерности генерации активных форм кислорода в сыворотке крови и исследуемых белковых растворах. Полученные результаты вносят существенный вклад в развитие представлений о воздействии электромагнитных излучений и эффективного их использования в молекулярной и клеточной медицине. Некоторые положения данной диссертационной работы могут быть использованы при написании рекомендаций к терапевтическим приборам, используемым в клинике. Не вызывает сомнений, что изучение долгоживущих активных форм белков и генерируемых ими активных форм кислорода может иметь в перспективе и практическое использование в медицинской практике. Содержание работы показывает, что задачи исследований выполнены автором в полном объеме и поставленная цель – достигнута. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания и вопросы к работе:

1) В методической части работы не полно описаны эксперименты по действию лазерного излучения. Отсутствует наглядное изображение этого эксперимента. Затруднительно оценить, какая часть исследуемых растворов подвергалась прямому действию лазера.

2) В Обзоре литературы было бы рационально выделить отдельную главу, посвященную ранее полученным в лаборатории результатам по тематике исследования. Это бы значительно упростило анализ состояния исследуемых задач, а также помогло бы в оценке новизны, полученных автором результатов. Сам Обзор мог бы быть в целом более компактным.

3) На титульном листе в названии диссертационной работы допущена опечатка в слове «электромагнитного», пропущена буква «н».

4) В тексте диссертации встречается небольшое количество пунктуационных ошибок, например:

Стр. 30 «Однако, такие реакции происходят в модельных соединениях ($k \sim 8 \times 10^6 \text{ с}^{-1}$) [Davies, Gilbert, 1991]»;

Стр. 123 «В данной работе выявлен повреждающий потенциал ДАФБ, как *in vitro* (Рисунок 21), так и *in vivo* (Рисунок 22)»;

Стр. 126 «Однако, это возможно только при низкоинтенсивных и непродолжительных воздействиях гелий-неонового лазера или теплового воздействия».

Отмеченные замечания носят рекомендательный и дискуссионный характер и не снижают общую положительную оценку данной работы, а также ее научную и практическую значимость.

Диссертационная работа В.Е. Иванова является завершенным исследованием, выполненным на современном методическом и аналитическом уровнях. Достоверность и научная значимость полученных данных, а также их новизна не вызывают сомнений. Диссертация соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор, Иванов Е.В., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – «Биофизика».

Соискатель имеет 39 опубликованных научных работ по теме диссертации, из них 10 статей в рецензируемых научных изданиях, включённых в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 29 тезисов в

материалах конференций. Опубликованные работы посвящены изучению возможности образования долгоживущих активных форм белков, генерации активных форм кислорода, в том числе наиболее долгоживущей формы – пероксида водорода, разработке методики оценки концентрации H_2O_2 в растворах белков и сыворотки крови при воздействии тепла и оптического электромагнитного излучения, а также исследованию адаптивного к окислительному стрессу и защитное действие сыворотки крови, подвергнутой гипертермии и лазерному облучению, путем предотвращения окислительных повреждений ДНК клеток крови при окислительном стрессе, обусловленном рентгеновским излучением. Опубликованные работы в полной мере отражают результаты диссертационного исследования.

Авторский вклад соискателя составляет 92%. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в диссертации Иванова В.Е. отсутствуют.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Ivanov V.E., Usacheva A.M., Chernikov A.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins induced by lowintensity irradiation of helium-neon laser and their involvement in the generation of reactive oxygen species // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2017. V. 176. P. 36-43.
2. Ivanov V.E., Karp O.E., Bruskov V.I., Andreev S.N., Bunkin N.F., Gudkov S.V. Formation of long-lived reactive products in blood serum under heat treatment and low-intensity laser irradiation, their role in hydrogen peroxide generation and DNA damage // Indian J. Biochem. Biophys. 2019. V. 56. P. 214-223.
3. Bruskov V.I., Popova N.R., Ivanov V.E., Karp O.E., Chernikov A.V., Gudkov S.V. Formation of long-lived reactive species of blood serum proteins by the action of heat // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014. V. 443(3). P. 957-961.
4. Shkirin A.V., Suyazov N.V., Chirikov S.N., Ivanov V.E., Gudkov S.V. Kinetics of the Light-Oxygen Effect in Aqueous Solutions of Proteins // Bulletin of the Lebedev Physics Institute. 2020. V. 47(3). P. 76-81.
5. Bruskov V.I., Chernikov A.V., Ivanov V.E., Karmanova E.E., Gudkov S.V. Formation of the Reactive Species of Oxygen, Nitrogen, and Carbon Dioxide in Aqueous Solutions under Physical Impacts // Phys. Wave Phenom. 2020. V. 28(2). P. 103-106.
6. Bruskov V.I., Karmanova E.E., Chernikov A.V., Usacheva A.M., Ivanov V.E., Emel'yanenko V.I. Formation of Hydrated Electrons in Water under Thermal Electromagnetic Exposure // Phys. Wave Phenom. 2021. V. 29(2). P. 94-97.
7. Иванов В.Е., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование

долгоживущих активных форм белков под действием тепла в растворах желатина и казеина // Биофизика. 2018. Т. 63(5). С. 873-879.

8. Иванов В.Е., Карп О.Э., Попова Н.Р., Черников А.В., Гудков С.В., Брусков В.И. Образование долгоживущих форм белков сыворотки крови под действием тепла // Альм. клин. мед. 2014. Т. 31. С. 17-20.

9. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А., Иванов В.Е., Черников А.В., Манохин А.А., Асташев М.Е., Ягужинский Л.С., Брусков В.И. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода // Биофизика. 2012. Т. 57(1). С. 5-13.

10. Гудков С.В., Иванов В.Е., Карп О.Э., Черников А.В., Белослудцев К.Н., Бобылёв А.Г., Асташев М.Е., Гапеев А.Б., Брусков В.И. Влияние биологически значимых анионов на образование активных форм кислорода в воде под действием неионизирующих физических факторов // Биофизика. 2014. Т. 59(5). С. 862-870.

Указанные публикации входят в перечень ВАК и международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов, все положительные. В отзывах указывается, что представляемая работа характеризуется высоким теоретическим и экспериментальным уровнем, по своей новизне и актуальности имеет большое научное и практическое значение, соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии. Отзывы получены из:

1. ГОУ ВО Московской области "Московский государственный областной университет" от д.м.н., доц., проректор по научной работе **Куликова Дмитрия Александровича**, содержит замечания:

- 1) Выводы могли бы содержать большее количество данных.
- 2) В главе «Материалы и методы» при описании экспериментальных животных вместо параметра «масса» использован «вес».

2. ФГБНУ "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН от д.с.-х.н., проф., главн. научн. сотр. **Ребезова Максима Борисовича**, без замечаний.

3. Воронежского государственного университета от д.б.н., проф., зав. каф. биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета **Артюхова Валерия Григорьевича** и д.б.н., доцент каф. биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета **Антипова Сергея Сергеевича**, содержит замечания:

- 1) В какой степени выводы диссертационной работы могут быть экстраполированы на другие модельные белковые системы?

2) Насколько исследуемые внешние факторы сопоставимы с точки зрения количества передаваемой энергии образцу? Если да, то отражается ли это на выраженности регистрируемых сигналов?

3) На рис. 8 приведены данные, свидетельствующие о снижении содержания полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в присутствии сыворотки крови животных, подвергнутых воздействию тепла и лазерного излучения. Есть ли предположения о механизмах формирования такого адаптивного ответа?

4. ФГБОУ ВО «МГТУ имени Н. Э. Баумана (национальный исследовательский университет) от д.ф.-м.н., проф., **Бункина Николая Федоровича**, без замечаний.

5. Филиала ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН от к.б.н., ст. науч. сотр., **Чернова Александра Сергеевича**, без замечаний.

6. Института фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН» от к.б.н., вед. науч. сотр., **Терентьева Василия Валерьевича**, без замечаний.

Указанные замечания не снижают общую высокую оценку диссертационной работы, а ее автор, Иванов Владимир Евгеньевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 - «Биофизика».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их соответствием критериям требований, изложенных в пп. 22 и 24 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842: являются компетентными по заявленной в диссертации соискателя специальности, имеют профильные публикации по проблеме диссертационного исследования и способны объективно оценивать актуальность темы диссертации, а также достоверность, теоретическую значимость и научно-практическую ценность полученных в работе результатов (сведения о них размещены на официальном сайте ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»: <https://diss.unn.ru/1152>).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- **разработан** новый методический подход на основе усиленной хемилюминесценции в системе люминол – пара-йодфенол – пероксидаза хрена, позволяющая измерять образование пероксида водорода в растворах белков и сыворотки крови под влиянием умеренной гипертермии и лазерного облучения; чувствительность метода позволяет определять H_2O_2 в концентрации около 0,1 нМ;

- **предложен** возможный физико-химический механизм, ведущий к образованию долгоживущих активных форм белков и пероксида водорода в белковых растворах под действием тепла и оптического электромагнитного излучения;

- **доказана** способность долгоживущих активных форм белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением с длинами волн, соответствующими линиям поглощения молекулярного кислорода, длительно генерировать АФК (синглетный кислород, супероксид анион-радикал, гидроксильный радикал, пероксид водорода);

- **введено** новое свойство сывороточных белков: под действием лазерного излучения или тепла в присутствии растворенного кислорода воздуха, они могут превращаться в ДАФБ, которые впоследствии генерируют H_2O_2 в течение длительного периода времени, в результате сопряженных электрон-радикальных цепных автокаталитических реакций;

- **показана** разница в уровне выхода долгоживущих активных форм белков казеина и гидролизата казеина при нагревании – в случае гидролизата казеина процесс происходил гораздо эффективнее по сравнению с казеином;

- **выявлен** с помощью микроядерного теста адаптивный эффект введения мышам сыворотки, подвергнутой тепловому либо лазерному воздействию, с последующим облучением мышей в дозе 1 Гр.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- **доказана** возможность образования ДАФБ в растворах бычьего сывороточного альбумина, гамма-глобулина, желатина, казеина и гидролизата казеина и в растворах сыворотки крови под действием тепла и оптического электромагнитного излучения с временами полужизни около 4–5 ч;

- **изложены** теоретические положения, дополняющие научные сведения о развитии и продлении окислительного стресса;

- **раскрыты** особенности и характер генерации H_2O_2 в белковых растворах при воздействии умеренной гипертермии и низкоинтенсивного лазерного излучения;

- **изучено** участие синглетного кислорода, гидроксильных и супероксид анион-радикалов в образовании пероксида водорода при воздействии тепла и оптического электромагнитного излучения;

- **охарактеризовано** влияние долгоживущих активных форм белков, индуцированных теплом и оптическим электромагнитным излучением, на окислительные повреждения ДНК *in vitro* и *in vivo*;

Проведена модернизация хемилюминесцентного метода оценки содержания H_2O_2 в растворах белков и сыворотки крови при воздействии тепла и оптического

электромагнитного излучения.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- **разработана** и внедрена методика оценки уровня H_2O_2 в растворах белков и сыворотки крови под влиянием умеренной гипертермии и лазерного облучения на основе усиленной хемилюминесценции в системе «люминол – пара-йодфенол – пероксидаза хрена»;

- **определены направления исследований для повышения эффективности использования** в медицинской практике излучения гелий-неонового лазера и умеренной гипертермии, предполагая участие в них долгоживущих активных форм белков и вторично образующегося пероксида водорода, который вызывает стимуляцию защитных и репарационных систем в клетках организма;

- **создана** система рекомендаций по изучению возможных путей и механизмов генерации АФК, в том числе H_2O_2 на примере воздействия тепла и оптического электромагнитного излучения;

- **представлены** предложения по использованию некоторых положений данной диссертационной работы для разработки и написании рекомендаций к медицинским приборам.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- **для экспериментальных работ** использовано актуальное и современное сертифицированное оборудование и адекватные методы математической и статистической обработки, обеспечивающие надежность и достоверность полученных данных; проведено достаточное число независимых экспериментов с применением широко используемых и хорошо зарекомендовавших себя методов, соответствующих цели и задачам, что позволяет оценить воспроизводимость результатов исследований;

- **теория** построена на известных данных образования долгоживущих активных форм белков под действием ионизирующего излучения и генерации ими активных форм кислорода;

- **идея** базируется на обобщении данных по текущему пониманию роли ДАФБ и АФК в развитии окислительного стресса и отдаленных патологических последствий;

- **использованы** различные современные методы и подходы исследования: метод собственной хемилюминесценции регистрации ДАФБ, метод усиленной хемилюминесценции в системе люминол – пара-йодфенол – пероксидаза хрена для определения концентрации пероксида водорода; использование флуоресцентного зонда кумарин-3-карбоновой кислоты для оценки уровня гидроксильных радикалов;

микроядерный тест для анализа цитогенетических повреждений клеток красного мозга мышей, а также неконкурентный твердофазный иммуноферментный анализ для определения 8-оксогуанина в ДНК;

- **установлено**, что результаты диссертационной работы согласуются с современными данными в области молекулярной и медицинской биофизики, не противоречат результатам исследований других авторов, расширяют и дополняют их, полученные результаты были апробированы при обсуждении на научных конференциях и симпозиумах регионального, российского и международного уровней, а также опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых журналах биофизического профиля, объём проведенных исследований достаточен для получения достоверных и подробных данных, необходимых для выполнения цели и задач, обоснования положений и выводов.

Личный вклад соискателя состоит в участии в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая изучение научной литературы по теме исследования, подбор рабочих концентраций используемых в работе препаратов, проведение исследований, сбор, обработку, интерпретацию полученных результатов, их анализ, обсуждение и графическое отображение, а также подготовку научных статей и представление результатов на конференциях.

Диссертация является целостным, законченным научным исследованием, охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критериям внутреннего единства, что подтверждается четкой логикой и соответствующей содержанию работы структурой исследования, формулировками цели работы и выводов на основании полученных результатов. Диссертация соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

- в работе очень кратко изложена методика исследования влияния долгоживущих активных форм белков сыворотки крови, индуцированной теплом или оптическим электромагнитным излучением;

- в автореферате диссертации не изучалось образование ДАФБ под действием электромагнитного излучения с длиной волны, отличной от 632,8 нм;

- в докладе основных результатов диссертационной работы не объяснено различие между интенсивностями хемилюминесценции бычьего сывороточного альбумина и гамма-глобулина при воздействии лазерного излучения или тепла.

Соискатель Иванов В.Е. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию, указав, что: введение сывороток крови, подвергнутых

воздействию тепла или лазерного излучения, не приводило к окислительным повреждениям ДНК *in vivo*, поэтому был применен метод проявляющей дозы, изложив основные стадии данного эксперимента; с помощью метода индуцированной хемилюминесценции при облучении лазером с $\lambda=632,8$ нм происходит генерация ДАФБ, при воздействии излучения с $\lambda=650$ нм образование ДАБФ не обнаруживалось (минимум в спектре поглощения O_2); учитывая молекулярные массы БСА и БГГ и концентрации этих белков, соответствующих максимальным значениям хемилюминесценции, можно сделать вывод о том, что величина люминесцирующих продуктов, образующихся под действием физических факторов на единицу массы этих белков, приблизительно одинакова.

На заседании 10 февраля 2022 года диссертационный совет принял решение за решение научной задачи по регистрации образования долгоживущих активных форм белков и генерации активных форм кислорода при воздействии тепла и оптического электромагнитного излучения, имеющей значение для развития биофизической науки присудить Иванову Владимиру Евгеньевичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.2 – биофизика, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за 15, против 1, недействительных бюллетеней 0.

Председатель

диссертационного совета

Воденеев Владимир Анатольевич

Ученый секретарь

диссертационного совета

Акинчиц Елена Константиновна



10 февраля 2022 года