

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Архиповой Евгении Владимировны «Структурно-функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных»

Актуальность избранной темы

Диссертационная работа Архиповой Е.В. посвящена проблеме изучения механизмов ответа мононуклеарных перитонеальных клеток на воздействие физико-химическими факторами. Актуальность темы работы определяется необходимостью разработки новых способов направленной регуляции активности клеток иммунной системы для дальнейшего клинического использования. Биологическое действие таких факторов как излучение плазмы искрового разряда и УФ-излучение изучено недостаточно, в связи с чем большое значение приобретают данные как об их влиянии как на структурные компоненты клеток, так и на их функциональную активность.

Достоверность и новизна исследования, степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Достоверность диссертационной работы определяется большим объемом используемого материала, повторяемостью результатов в нескольких независимых экспериментах, анализом данных с привлечением стандартных методов биомедицинской статистики.

Новизна работы заключается в том, что автором впервые проведена комплексная оценка влияния излучения плазмы на структурное состояние мембран и функциональную активность мононуклеарных перитонеальных клеток. Показано, что кратковременные режимы воздействия излучением плазмы оказывают стимулирующее действие на функциональную активность перитонеальных клеток, а длительные режимы снижают способность к активации. Установлено, что основными процессами в механизмах снижения функциональной активности после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением на мононуклеарные перитонеальные клетки являются изменения фосфолипидного спектра, увеличение микровязкости, десИАлирование клеточной поверхности и модификация белков. Выявлено, что излучение плазмы и УФ-излучение разнонаправленно действуют на состояние жирнокислотного слоя

фосфолипидов: излучение плазмы искрового разряда — разрыхляет, а УФ-излучение уплотняет его. Излучение плазмы интенсивнее окисляет ароматические аминокислоты: тирозин и триптофан, а УФ-излучение способствует образованию сшивок между углеводами и белками. Впервые установлено, что излучение плазмы в отличие от УФ-излучения активизирует потенциальную способность перитонеальных клеток отвечать на стимуляцию. Излучение плазмы искрового разряда уменьшает время наступления «кислородного взрыва», а УФ-излучение увеличивает. Впервые в эксперименте *in vivo* показано стимулирующее действие на функциональную активность мононуклеарных перитонеальных клеток излучения плазмы, что выражается в усилении адгезивных свойств, активации процессов фагоцитоза и кислородзависимого метаболизма.

Диссертационная работа выполнена на корректно подобранной экспериментальной модели с использованием общепринятых научных методов. Результаты работы прошли рецензирование в российских и зарубежных журналах и широко обсуждались на конференциях. Сформулированные положения и выводы отражают основные результаты исследования и не противоречат работам других авторов по данной тематике.

Значимость результатов для науки и практики

Результаты исследования могут быть востребованы в таких областях науки как физиология, экспериментальная и клиническая медицина, иммунология, медицинская физика. Полученные в работе данные важны как для понимания закономерностей ответа клеток живых организмов на воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением, так и для разработки новых и совершенствования существующих способов терапии на основе физико-химических факторов. Результаты работы могут быть использованы в образовательном процессе при проведении теоретических и практических занятий по физиологии, биофизике, биохимии.

Характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа Ахиповой Е.В. содержит введение, три главы, заключение, выводы и список литературы. Общий объем диссертации составляет 136 страниц, включая 17 рисунков и 8 таблиц. Список литературы представлен 245 источниками.

В первой главе, включающей обзор литературы, представлены и обобщены современные данные по тематике механизма действия различных электромагнитных

факторов на клетки живых организмов, в том числе клетки иммунной системы. Автором дано описание морфофункциональных особенностей перитонеальных макрофагов в норме и после воздействия электромагнитными факторами. Приведены основные сведения об УФ-излучении и газоразрядной плазме и представлены имеющиеся в литературе данные об их воздействии на макрофаги. Обзор литературы дает хорошее представление об изучаемой проблеме и обосновывает необходимость проведения представленных в работе экспериментальных исследований.

В Главе 2 приведено описание использованных в работе материалов и методов. В работе воздействие УФ-излучением и газоразрядной плазмой на макрофаги осуществлялось с использованием различных режимов как *in vitro*, так и *in vivo*. Для изучения структурно-функционального состояния перитонеальных макрофагов использован комплекс современных биохимических, биофизических, цитологических и культуральных методов. Автором использовано современное оборудование для лазерной интерференционной микроскопии, спектрофотометрии, флуориметрии, люминометрии. Методы исследования адекватны поставленным задачам.

Глава 3 посвящена полученным в ходе диссертационной работы собственным результатам. На первом этапе исследования по результатам оценки цитотоксических эффектов УФ-излучения и газоразрядной плазмы в отношении перитонеальных макрофагов в зависимости от длительности воздействия автор делает заключение о значительном снижении числа клеток только на после длительного воздействия (более 300 секунд). На данных сроках также продемонстрировано изменение морфологических параметров клеток: уменьшение фазовой высоты и увеличение средней площади.

Далее при сравнении влияния используемых воздействий на липидный состав выявлено более раннее снижение количества фосфолипидов и повышение содержания эфиров холестерина при использовании газоразрядной плазмы по сравнению с УФ-излучением. При анализе окислительной модификации белков автором показано индуцированное обоими типами воздействий существенное накопление гликозилированных белков, но не карбонильных их производных. При этом накопление гликозилированных белков происходило уже на ранних сроках воздействия. Автором исследована микровязкость в области липид-липидных контактов мембран и выявлено ее повышение при длительных экспозициях при обоих типах воздействий. Однако в области белок-липидных контактов микровязкость росла уже после 30 секунд

экспозиции, демонстрируя более быстрый ответ на воздействие как УФ-излучением, так и газоразрядной плазмой. Анализ гидрофобности углеводородного слоя мембран показал, что на поздних сроках воздействия при использовании плазмы значения данного показателя снижаются, а при использовании УФ-излучения растут. Автор демонстрирует потерю сиаловых кислот клетками при длительных экспозициях и предполагает снижение способности к клеточному взаимодействию.

Следующим шагом работы было изучение влияния излучения плазмы и УФ-излучения на функциональное состояние перитонеальных макрофагов. Автором показано, что на ранних сроках воздействия УФ-излучением и газоразрядной плазмой временно повышается адгезивная способность клеток. В дальнейшем наблюдается уменьшение данного показателя. Продemonстрировано снижение активности миелопероксидазы на поздних сроках воздействия. Выявлено, что рост уровня спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции, отражающей содержание активных форм кислорода, был временным в случае воздействия излучением плазмы и длительным при воздействии УФ-излучением. При этом подъем индуцированной хемилюминесценции сопровождал только ранние сроки после обоих типов воздействий.

Завершающим этапом работы было исследование ответа перитонеальных макрофагов на воздействие плазмы искрового разряда *in vivo*. Автором показано, что при выбранных режимах жизнеспособность клеток существенно не изменяется, также неизменным остается содержание сиаловых кислот и активность миелопероксидазы. При этом адгезивные свойства клеток, а также их фагоцитарная и метаболическая активность усиливаются при трехкратной обработке длительными экспозициями, что может свидетельствовать в пользу активирующего действия данных режимов в отношении макрофагов.

Полученные в работе результаты систематизированы и представлены в виде схемы, иллюстрирующей пути регулирования процессов снижения или повышения функциональной активности перитонеальных макрофагов после воздействия излучением плазмы.

Замечания и вопросы

В работе выявлены различия в ответе перитонеальных макрофагов на воздействие плазмой в зависимости от его продолжительности. Показано, что при кратковременном

воздействии преобладают процессы, характеризующие активацию клеток, тогда как при длительном воздействии наиболее значимыми являются процессы деактивации и потери жизнеспособности. Можно ли предположить последовательность событий, при которой уже активированные клетки при продолжающемся действии стимула теряют активность и гибнут?

При описании методик *in vitro* экспериментов было бы важно указать, проводились ли измерения непосредственно после воздействия излучением плазмы и УФ-излучением, либо после определенного временного интервала. Через какое время после окончания воздействия изучались все параметры в экспериментах *in vitro*?

Результаты МТТ теста после воздействия *in vitro* (рис. 4) показали постепенное снижение процента жизнеспособных (накопивших формазан) клеток с повышением времени воздействия. С чем может быть связано такое снижение? Предполагается гибель клеток, прекращение их деления или снижение метаболической активности?

В чем причина различий, полученных в *in vitro* и *in vivo* экспериментах при изучении цитотоксичности, процессов десалирования клеточных мембран, активности миелопероксидазы при сходных режимах воздействия?

Изложенные замечания не являются принципиальными и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Заключение

Диссертационная работа Архиповой Евгении Владимировны «Структурно-функциональное состояние мононуклеарных перитонеальных клеток после воздействия излучением плазмы искрового разряда и УФ-излучением» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи изучения ответа клеток иммунной системы на воздействие физико-химическими факторами. Работа характеризуется значительной научной новизной, ее результаты достоверны и имеют перспективы практического применения. К несомненным достоинствам диссертационной работы следует отнести широкий спектр различных методических подходов, позволивших провести комплексное исследование структурно-функционального состояния мононуклеарных клеток. Основные результаты работы опубликованы и неоднократно представлялись автором в рамках участия в конференциях. Работа написана доступным и понятным языком, хорошо

структурирована, иллюстрирована схемами и рисунками. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, а ее автор, Архипова Евгения Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Официальный оппонент:
Старший научный сотрудник
Отдела радиофизических методов
в медицине ИПФ РАН,
кандидат биологических наук



Анна Геннадьевна Орлова

Подпись Орловой Анны Геннадьевны заверяю
Ученый секретарь ИПФ РАН,
кандидат физико-математических наук



Игорь Валерьевич Корюкин

16.05.2022

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук» (ИПФ РАН)

Адрес: 603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46.

Телефон: +7 (831) 416 4804

E-mail: ag.orlova@mail.ru