

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Надеева Александра Петровича на диссертационную работу Яковенко Дарьи Валерьевны на тему: «Закономерности изменения анаболических процессов при окислительном стрессе и его коррекции дигидрокверцетином у белых крыс», представленной к защите в объединенный совет по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук 99.0.062.02 (Д 999.199.02) при ДНЦ ФПД и ФГБОУ ВО Амурской ГМА Минздрава России на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

Актуальность темы диссертации

Окислительный стресс, как основной патогенетический фактор повреждения различных органов и систем, на протяжении многих лет остается важной проблемой современной медицины и биологии. Ведущей причиной окислительного стресса в раннем постнатальном онтогенезе является антенатальная гипоксия, занимающая первое место в структуре перинатальной заболеваемости и смертности. Внутриутробная гипоксия приводит к задержке развития плода и рождению маловесных детей, повреждению головного мозга, нарушениям со стороны сердечно-сосудистой и дыхательной систем, способствует формированию хронических заболеваний и инвалидности у лиц старших возрастных групп, что обуславливает значительную медико-социальную роль этой патологии. Все это определяет необходимость поиска новых подходов к коррекции окислительного стресса у лиц разных возрастных групп для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний.

Эзогенные антиоксиданты широко используются в виде биологически активных добавок и лекарственных средств. Вместе с тем, в научной литературе содержатся противоречивые данные о влиянии эзогенных антиоксидантов

на пролиферативные и анаболические процессы в тканях и клетках организма; отсутствует анализ онтогенетических и тканеспецифических особенностей влияния антиоксидантов. Кроме того, имеются сведения о негативном влиянии избыточного подавления свободнорадикального окисления («восстановительного стресса») на жизнедеятельность клеток. Таким образом, необходимость изучения роли продукции активных кислородных метаболитов в различных клеточных популяциях в разные периоды онтогенеза, в физиологических условиях и при окислительном стрессе определила актуальность и своевременность диссертационного исследования Д.В. Яковенко.

Научная новизна основных выводов и результатов

Научная новизна представленного диссертационного исследования не вызывает сомнений. В ходе решения поставленных задач Яковенко Д.В. получила ряд новых научных данных. В работе впервые проведен сравнительный анализ состояния клеточных популяций различной тканевой принадлежности и эмбрионального происхождения у новорожденных животных при неонатальном введении дигидрокверцетина (ДГК) и его влияние на интактных новорожденных белых крыс и животных, перенесших антенатальную гипоксию. Автором впервые показано, что введение антиоксиданта не вызывает негативных последствий для организма новорожденных белых крыс как у интактных животных, так и после антенатальной гипоксии. В частности, автором выявлено, что ДГК устраняет такие негативные последствия антенатальной гипоксии, как снижение массы сердца, подавление ДНК-синтетической активности клеток эпидермиса, печени, головного мозга и сердца. Продемонстрировано, что предварительное (перед гипоксическим воздействием) введение ДГК половозрелым животным способно вызвать разнонаправленные, как положительные, так и отрицательные, эффекты в отношении анаболической активности различных клеточных популяций. Показано, что в группе новорожденных животных после антенатальной гипоксии ДГК обладает большой активностью в отношении нейронов головного мозга. Автором выявлена тканеспецифическая реакция различных клеточных популяций половозрелых белых крыс на изменение

уровня активных форм кислорода: коррекция антиоксидантом избыточного уровня активных форм кислорода при окислительном стрессе снижает показатели нуклео-нуклеолярного аппарата клеток сердца, но нормализует количество ядрышек в клеточных популяциях желудочно-кишечного тракта. Снижение концентрации активных форм кислорода ниже физиологического уровня, при воздействии антиоксиданта на интактном фоне, угнетает нуклео-нуклеолярный аппарат кардиомиоцитов, миоцитов кишечника, экзокриноцитов поджелудочной железы, уменьшает пролиферативную активность эпителиоцитов роговицы, но увеличивает количество ядрышек в ядрах нейронов неокортекса, что сопровождается повышением уровня фактора роста нервов в сыворотке крови животных, что позволяет говорить о нейротрофическом действии ДГК.

Теоретическая и практическая значимость

В диссертационном исследовании Яковенко Д.В. показано, что изменения в организме новорожденных мышей, возникающие после антенатальной гипоксии, в виде снижения массы тела, сердца, печени; угнетения ДНК-синтетических процессов в нейронах головного мозга, кардиомиоцитах, гепатоцитах, эпителиоцитах кожи; уменьшение показателей нуклеолярного аппарата клеток головного мозга, энамелобластов и гепатоцитов. Автором представлено экспериментальное обоснование возможности клинического применения ДГК как перспективного средства для коррекции неблагоприятных изменений, возникающих при антенатальной гипоксии. Отсутствие негативных последствий введения ДГК в периоде новорожденности и высокая эффективность коррекции антиоксидантом нарушений, вызванных антенатальной гипоксией, можно рассматривать как обоснование внедрения антиоксидантной терапии в неонатологию. Сведения, полученные автором в отношении тканеспецифиности эффектов антиоксиданта у половозрелых животных, могут учитываться при установлении показаний и противопоказаний к применению фармакологических препаратов антиоксидантного действия, а также к профилактическому использованию биологически активных добавок на основе антиоксидантов биофлавоноидной природы. Полученные Д.В. Яковенко сведения могут быть ис-

пользованы для чтения курса лекций по патологической физиологии, фармакологии, неонатологии, терапии.

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

Диссертационная работа Яковенко Д.В. выполнена на достаточном объеме экспериментального материала: *in vivo* (на белых крысах линии Wistar) и *in vitro* (на первичной культуре пульмональных фибробластов). В исследовании использован комплекс современных методов исследования: патофизиологический, биохимический, гистологический, морфометрический, авторадиографический, иммуноферментный, статистический. Научные положения и выводы диссертационной работы обоснованы достаточным объемом выполненных исследований: работа выполнена на 378 животных с использованием сертифицированного оборудования и реагентов.

Диссертация Д.В. Яковенко написана в традиционном стиле, изложена на 165 страницах. Список литературы включает 425 источников, в том числе 144 работы отечественных и 281 - иностранных авторов. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3-х глав собственных данных, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность имеющейся научной проблемы, формулирует цель, задачи исследования. Научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, сформулированы четко и не вызывают вопросов.

Глава «Обзор литературы» содержит информацию об имеющихся литературных научных данных по изучаемой проблеме. В частности, подробно описана роль физиологической и избыточной концентрации активных форм кислорода в жизнедеятельности организма; рассматриваются материалы публикаций, посвященных изучению роли активных форм кислорода в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной и пищеварительной систем, опухолевого роста; проанализированы данные научной литературы об эффектах антиок-

сидантов биофлавоноидной природы, что позволило обосновать цели и задачи диссертационного исследования. Содержание обзора свидетельствует о хорошем знании Д.В. Яковенко современного состояния решаемой научной проблемы, что подтверждается цитированием научных статей, опубликованных, преимущественно, в течение последних 5-10 лет.

В главе «Материалы и методы» автором подробно описаны использованные методы исследования: патофизиологический, биохимический, радиоавтографический, цитологический, морфометрический, иммуноферментный. Эксперимент проведен *in vivo* и *in vitro*. Животных разделили на 6 групп: новорожденные животные, подвергнутые антенатальной гипоксии; половозрелые животные, подвергнутые гипобарический гипоксии, и животные, которым вводили антиоксидант ДГК (для половозрелых животных – до гипоксического воздействия; для новорожденных – в неонatalный период после антенатальной гипоксии), а также группа новорожденных и половозрелых животным, которым вводили ДГК. Для создания антенатальной гипоксии автором была использована хорошо апробированная в лаборатории модель гипобарической гипоксии. Объектом исследования *in vitro* служила первичная культура пульмональных фибробластов 1-суточных белых крыс породы Wistar. В исследовании автор применял сертифицированный ДГК производства ООО «Аметис» (Россия) и ДГК фирмы SigmaAldrich (США). Обработка полученных данных и статистический анализ экспериментальных исследований выполнен корректно, с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты исследования представлены в третьей главе. Подробно и доказательно представлены показатели пролиферативной и анаболической активности различных клеточных популяций интактных новорожденных и половозрелых животных, подвергнутых гипобарической гипоксии и введению исследуемого антиоксиданта. В ходе проведенного экспериментального исследования *in vitro* были показаны эффекты окислительного стресса и влияния ДГК в первичной культуре пульмональных фибробластов, что позволяет говорить о прямых эффектах биофлавоноида.

В подглаве 3.1 показано, что реакция организма на окислительный стресс в периоде новорожденности и у взрослых половозрелых крыс была принципиально сходной и выражалась в угнетении анаболических процессов в различных клеточных популяциях. Сходный эффект мы наблюдали и при воздействии окислительного стресса на первичную культуру пульмональных фибробластов. В подглаве 3.2 продемонстрировано, что у взрослых животных введение антиоксиданта ДГК перед воздействием гипоксии улучшало состояние некоторых клеточных популяций (миоциты мышечной оболочки двенадцатиперстной кишки, экзокриноциты поджелудочной железы), в то время как в других (кардиомиоциты, эпителиоциты роговицы) патологическое состояние нуклео-нуклеолярного аппарата потенцировалось. В подглаве 3.3 автор показал, что реакция новорожденных животных на воздействие антиоксиданта была однозначной: во всех исследованных клеточных популяциях ДГК корректировал неблагоприятные последствия антенатального гипоксического воздействия. Введение антиоксиданта половозрелым животным на интактном фоне привело к снижению показателей нуклео-нуклеолярного аппарата кардиомиоцитов, миоцитов двенадцатиперстной кишки, экзокриноцитов поджелудочной железы; уменьшению пролиферативной активности эпителиоцитов переднего эпителия роговицы, сочетанное со значительным возрастанием количества патологических митозов. Пятикратное введение ДГК новорожденным животным с 2 по 6 сутки жизни (на интактном фоне) стимулировало синтез ДНК в нейронах головного мозга, повышало анаболическую активность гепатоцитов и кардиомиоцитов. Воздействие ДГК *in vitro* уменьшало генерацию супероксид-анион радикала в культивируемых фибробластах и снижало показатели нуклео-нуклеолярного аппарата клеток.

В «Обсуждении» и кратком «Заключении» автор провел анализ и обсуждение полученных данных, используя современные научные публикации, кратко сформулировал основные результаты проведенного диссертационного исследования, представил концептуальные схемы механизмов влияния окисли-

тельного стресса и антиоксиданта на анаболическую и пролиферативную активность различных клеточных популяций.

В 8-ми выводах отражены основные результаты исследования, которые полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

В диссертационной работе имеются опечатки (например, с. 50, 75, 86, и другие), стилистические нарушения. Однако указанные замечания являются техническими и не умаляют проведенного автором научного исследования.

По теме диссертации опубликованы 23 печатные работы, отражающие основные положения диссертации, из них 5 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы и оформлен в соответствии с требованиями ВАК.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные данные могут быть использованы в учебном процессе по дисциплинам патологическая физиология, патология, фармакология, гистология. Кроме того, экспериментальные данные, полученные автором, могут учитываться для определения показаний и противопоказаний к приему антиоксидантов с профилактической и лечебной целью при различных патологических состояниях, сопровождающихся дефицитом кислорода и снижением антиоксидантной защиты организма.

В процессе рассмотрения диссертации появились вопросы к автору, которые требуют обсуждения.

1. Известно, что окислительный стресс индуцирует апоптоз в клетках. Автор наблюдал увеличение количества патологических митозов в эпителиоцитах роговицы. В этой связи, наблюдал ли автор патологические митозы в других органах новорожденных крыс и отмечал ли наличие апоптотических изменений клеток в исследованных тканях?
2. Чем обусловлены тканеспецифические эффекты дигидрокверцетина? Можно ли связать полученные автором данные влияния дигидрокверцетина на клетки различных тканей с их функциональной активностью?

Заключение

Диссертационная работа Яковенко Дарьи «Закономерности изменения анаболических процессов при окислительном стрессе и его коррекции дигидрокверцетином у белых крыс», выполненная при научном руководстве доктора медицинских наук, профессора Е.Н. Сазоновой, является законченной научно-квалификационной работой, в которой исследованы закономерности изменения анаболических процессов при окислительном стрессе и его коррекции антиоксидантом дигидрокверцетином в различных клеточных популяциях белых крыс, что имеет существенное значение для патологической физиологии, неонатологии и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, установленным п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.13 (с изменениями), а ее автор заслуживает ученоей степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. – патологическая физиология.

Официальный оппонент

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой патологической анатомии
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет» Минздрава РФ
«31 » августа 2021 г.

А.П. Надеев



Адрес: 630091 г. Новосибирск,
Красный проспект, 52
Тел.: 7 (383) 222-32-04
Эл.почта: rectorngmu@yandex.ru
Сайт: <https://www.ngmu.ru>

Подпись

д-ра мед. наук, профессора Надеева Александра Петровича

заверяю

Начальник отдела кадров

О.А. Кох

«31» августа 2021 г.

