

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, руководителя лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов ФИЦ ФТМ Меньшиковой Елены Брониславовны, на диссертационную работу Яковенко Дарьи Валерьевны «Закономерности изменения анаболических процессов при окислительном стрессе и его коррекции дигидрохверцетином у белых крыс», представленную к защите в объединённый совет по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата биологических 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

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), или, как в случае со злокачественными новообразованиями, переродившиеся клетки берут на вооружение собственные способы защиты хозяина и противостоят попыткам их элиминировать.

Формирование представлений об окислительном стрессе как универсальном патогенетическом факторе в последние десятилетия значительно актуализировало исследования в области изучения биоантиоксидантных и фармакологических свойств фенольных соединений, в том числе флавоноидов. Попытки «лобового» решения проблемы путем неизбирательного назначения мегадоз антиоксидантов или поиска «идеального антиоксиданта» потерпели фиаско в силу обозначенной выше неоднозначности редокс-биологии и непредсказуемости результата грубого вмешательства в механизмы поддержания редокс-баланса, особенно когда это касается деления клеток и пролиферации.

В этой связи очевидна актуальность диссертационного исследования Д.В. Яковенко, помогающего восполнить пробелы в изучении тканеспецифических и онтогенетических особенностей реакций организма *in toto* на развитие окислительного стресса и в условиях воздействия антиоксиданта, при этом делая акцент на возможность влияния последнего на редокс-регуляцию.

Научная новизна основных выводов и результатов.

Научная новизна диссертационной работы Яковенко Д.В. соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Впервые проведен анализ тканеспецифических особенностей реакции широкого спектра клеточных популяций новорожденного и половозрелого организма на окислительный стресс. Показано, что в условиях *in vitro* и *in vivo* имеет место практически универсальное угнетающее влияние гиперпродукции АКМ на нуклео-нуклеолярный аппарат клеток.

Впервые выявлено, что воздействие антиоксиданта дигидрокверцетина в периоде новорожденности оказывает однозначное позитивное влияние на различные ткани белых крыс, находящихся в состоянии окислительного стресса после перенесенной внутриутробной гипоксии. Также важно, что введение дигидрокверцетина новорожденным животным на интактном фоне не вызывает негативных изменений исследуемых параметров. Таким образом, впервые дано экспериментальное обоснование безопасности использования флавоноида дигидрокверцетина в раннем детском возрасте при коррекции неблагоприятных последствий внутриутробной гипоксии.

Впервые проанализирована неоднозначная тканеспецифическая реакция различных клеточных популяций половозрелых белых крыс на воздействие

окислительного стресса, развившегося при моделировании гипобарической гипоксии, при предварительном введении дигидрохверцетина. Наряду с позитивным нормализующим влиянием антиоксиданта на хемилюминесцентные показатели системного и тканевого редокс-статуса обнаружен неблагоприятный эффект на нуклео-нуклеолярный аппарат кардиомиоцитов и митотическую активность переднего эпителия роговицы. Аналогичное негативное действие дигидрохверцетин оказывал на эти клеточные популяции при введении интактным половозрелым белым крысам. Интересна гипотеза автора о том, что кардиомиоциты и эпителиоциты роговицы имеют развитую антиоксидантную систему и характеризуются значительным вовлечением АКМ в регуляцию анаболических процессов, в этих условиях дополнительное введение экзогенного антиоксиданта способно ухудшить состояние клеток. Аналогичный механизм может иметь и негативное влияние дигидрохверцетина на ядерно-ядрышковый аппарат культивируемых фибробластов при воздействии антиоксидантов на интактном фоне.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты диссертационной работы Яковенко Д.В., несомненно, имеют теоретическую значимость. Диссертанту удалось на разных экспериментальных моделях нарушений редокс-гомеостаза продемонстрировать дуализм эффектов АКМ на анаболические процессы: как деструктивных, в условиях окислительного стресса, так и регуляторных, в физиологических условиях. Полученные сведения о тканеспецифических и онтогенетических особенностях реакции различных клеточных популяций на изменение стационарной концентрации АКМ расширяют фундаментальные представления о редокс-сигнализации.

В результате исследования доказана возможность коррекции негативных постгипоксических изменений в раннем постнатальном периоде онтогенеза с помощью экзогенного флавоноидного антиоксиданта. Полученные соискателем данные позволяют говорить о перспективе применения препаратов на основе дигидрохверцетина в педиатрической практике. Вместе с тем сведения о неоднозначном влиянии введения дигидрохверцетина половозрелым животным перед гипоксическим воздействием определяют необходимость тщательного анализа рекомендаций профилактического применения антиоксидантов такого рода.

Избирательное позитивное влияние дигидрохверцетина на состояние нейронов головного мозга, сопровождающееся повышением сывороточного

содержания фактора роста нервов, позволяет предполагать нейротрофическое действие флавоноида и рекомендовать его к проведению клинических исследований при неврологической патологии.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс (курс лекций) кафедр нормальной и патологической физиологии, фармации и фармакологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава РФ.

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

Диссертационная работа Яковенко Д.В. имеет чёткую логическую последовательность и дизайн. Цели и задачи соответствуют теме диссертации; выводы и положения, выносимые на защиту, практические рекомендации следуют из полученных результатов исследования.

Достоверность полученных результатов доказывается большим объемом исследованного материала, использованием современного сертифицированного оборудования и корректной статистической обработкой полученных данных.

Диссертация Яковенко Д.В. написана по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, главу собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, список использованных сокращений, список цитируемой литературы (425 источников). Диссертация изложена на 165 страницах, содержит 35 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 личное участие автора, приводит публикации по исследуемой теме.

Глава «Обзор литературы» включает в себя пять подглав, раскрывающих сведения о влиянии АКМ на клетку в зависимости от интенсивности их генерации; об основных свойствах и эффектах флавоноидов, их применении в клинической практике, механизмах и «точках приложения» антиоксидантного эффекта растительных флавоноидов, в том числе исследуемого дигидрокверцетина; об особенностях влияния флавоноидов на процессы анаболизма и пролиферации.

В главе «Материал и методы исследования» приведено подробное описание методов моделирования окислительного стресса у новорождённых и взрослых животных, а также в первичной культуре пульмональных фибробластов. Для анализа процессов анаболизма и пролиферации в исследуемых тканях применялись современные биохимические, морфологические, гистохимические методы. 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 исследования» имеет 3 подраздела, описывающие основные результаты диссертационного исследования Яковенко Д.В., отражённые в таблицах и рисунках. Первый подраздел включает в себя данные о влиянии окислительного стресса на исследуемые модели *in vivo* и *in vitro*. Установлено, что во всех исследуемых клеточных популяциях наблюдалось снижение или практически полная блокада пролиферативной и анаболической активности. Второй подраздел посвящен попытке корригировать зарегистрированные изменения с помощью экзогенного антиоксиданта. Полученные данные свидетельствуют о тканеспецифичности и онтогенетических особенностях: у новорождённых животных и в культуре пульмональных фибробластов дигидрокверцетин оказывал цитопротективное действие, в то время как у половозрелых крыс вызывал разнонаправленные эффекты в различных клеточных популяциях. В третьем подразделе описан эффект исследуемого антиоксиданта *in vivo* и *in vitro* в интактных условиях, без моделируемого окислительного стресса. Представленные данные говорят о том, дигидрокверцетин при его использовании на фоне оптимального редокс-статуса имеет способность угнетать пролиферативную и анаболическую активность некоторых клеточных популяций.

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. Для удобства восприятия и обобщения итогов исследования составлены сводные таблицы о влиянии дигидрохверцетина на состояние клеток исследованных клеточных популяций и анализ типа реакций, а также концептуальные схемы роли антиоксиданта при применении его при различных редокс-статусах исследуемых клеточных популяций. В частности, из обсуждения отнесения кардиомиоцитов к группе II клеточных популяций по характеру их ответа на введение дигидрохверцетина на фоне гипобарической гипоксии следует, что необходимо с осторожностью подходить к назначению экзогенных антиоксидантов при комплексной терапии последствий ишемии/реперфузии. Глава завершается обобщающим заключением.

В целом можно сказать, что в результате проведенного диссертационного исследования цель работы достигнута. Выводы научно обоснованы и корректны, соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Библиографический список использованных литературных источников составлен корректно, с использованием современных источников.

Автореферат диссертации Яковенко Д.В. 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 23 печатные работы (5 – 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, на стр. 13 неправильно обозначены радикальные формы АКМ, здесь же – «перекисное окисление биомолекул» (в данном контексте – «свободнорадикальное»); на стр. 17–18: «NADPH-оксидаза» (в действительности это не один фермент, а семейство NAD(P)H-оксидаз); по тексту часто

встречаются выражения «растительные биоантиоксиданты» (тавтология), «проапоптотический» («проапоптотический»); на стр. 33–34: MAP-киназы не являются ядерными факторами транскрипции; стр. 34: «полная элиминация АФК» невозможна, поскольку они непрерывно образуются в живых организмах.

Вопросы для дискуссии:

1. Чем обусловлен выбор дигидрокверцетина в качестве корректирующего антиоксиданта? Утверждение автора о том, что он «является эталонным антиоксидантом», спорны. Так, поиск в PubMed по комбинации «dihydroquercetin AND antioxidant» дает 635 записей, в то время как «quercetin AND antioxidant» – 15088, а, например, для токоферола (общепризнанного «эталонного» антиоксиданта), «tocopherol AND antioxidant» их число составляет 20753.

2. Чем можно объяснить разнонаправленность изменения массы сердца в ответ на гипобарическую гипоксию у взрослых животных и 7-суточных крысят?

3. В разделе 3.1.3 приведены данные об уменьшении абсолютных значений параметров нуклео-нуклеолярного аппарата первичных фибробластов (площадь ядра, количество и площадь ядрышек) под действием пероксида водорода. Не было ли это просто следствием уменьшения количества фибробластов (гибели)?

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

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы диссертации целесообразно использовать в научной, образовательной и лечебной деятельности НИИ и вузов, при исследовании методов профилактики и последствий заболеваний, сопровождающихся нарушениями редокс-баланса, а также включать в учебные программы для студентов, аспирантов и клинических ординаторов, при подготовке специалистов в области фундаментальной и клинической медицины.

Заключение

Диссертационная работа Яковенко Дарьи Валерьевны «Закономерности изменения анаболических процессов при окислительном стрессе и его коррекции дигидрокверцетином у белых крыс» является оригинальной, законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи анализа тканеспецифических и онтогенетических закономерностей изменения анаболических процессов при изменении редокс-гомеостаза

различных клеточных популяций, имеющей значение для развития патологической физиологии. 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, Яковенко Дарья Валерьевна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

Официальный оппонент

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

31 августа 2021 г.