

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» **Даренской Марины Александровны** на диссертационную работу Барсковой Людмилы Сергеевны на тему «Патофизиологические механизмы нарушения прооксидантно-антиоксидантных процессов в альвеолярных макрофагах крыс линии Вистар при воздействии твердых взвешенных частиц различной дисперсности», представленную к защите в объединенный совет по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 999.199.02 при ДНЦ ФПД и ФГБОУ ВО Амурской ГМА Минздрава России на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология (медицинские науки)

### **Актуальность темы диссертации**

Загрязнение воздушной среды является одним из главных экологических факторов риска для здоровья населения. Многочисленные эпидемиологические и клинические исследования подтверждают развитие кардиореспираторных заболеваний у жителей крупных городов и мегаполисов с высоким уровнем техногенной нагрузки. В этих условиях значительный интерес представляют исследования воздействия на клетки органов дыхания твердых взвешенных частиц, загрязняющих атмосферный воздух в «зоне дыхания» человека. Дыхательная система наиболее открыта для проникновения атмосферных загрязнителей во внутреннюю среду организма. Размер частиц определяет уровень их оседания в респираторном тракте и глубину проникновения в организм. И поскольку дисперсный состав частиц различается для территорий с различной техногенной нагрузкой, то

немаловажным представляется изучение токсического воздействия различных по размерности микрочастиц.

Современные литературные данные, посвященные изучению воздействия твердых микрочастиц, свидетельствуют о вовлечении активных кислородных метаболитов в патологические процессы взаимодействия клеток органов дыхания с данными частицами. Однако, в основном, изучается окислительный спектр событий в контактных клетках и тканях, в то время как формирование редокс-дисбаланса клетки и развитие патологии зачастую происходят при недостаточности антиоксидантного ответа. Несмотря на то, что роль окислительного стресса в генезе и прогрессировании бронхолегочных заболеваний изучается достаточно давно, в области исследований патофизиологических механизмов ответной реакции альвеолярных макрофагов на воздействие твердых взвешенных частиц сохраняются открытые вопросы. Остаются практически не изученными изменения в системе «перекисное окисление – антиоксидантная защита» альвеолярных макрофагов в результате воздействия твердых микрочастиц.

Таким образом, моделирование воздействия твердых микрочастиц в экспериментальных условиях, изучение особенностей ответной реакции альвеолярных макрофагов и выделение биоиндикаторов токсического повреждения клетки, ставшие целью данного исследования, являются весьма актуальным направлением.

#### **Научная новизна основных выводов и результатов**

Диссертационное исследование Л.С. Барсковой является фундаментальной научной работой. В работе впервые установлены особенности фракционного распределения твердых взвешенных частиц в приземном слое атмосферного воздуха двух районов города Владивостока, различающихся по техногенной нагрузке. Автором впервые установлено, что ответная реакция клетки обусловлена содержанием в модельных взвесах фагоцитируемых альвеолярными макрофагами частиц, способных усиливать выработку активных форм кислорода.

Впервые на основе определения корреляционных связей показана зависимость образования гидроперекисей липидов, малонового альдегида, протеин карбонила и 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина, характеризующих окислительное повреждение альвеолярных макрофагов, от дисперсного и качественного состава модельных взвесей. Доля вклада качественных характеристик микрочастиц в формирование нарушений окислительно-восстановительного гомеостаза составила от 52,6% до 66,7%, при увеличении в модельной взвеси количества мелкодисперсных частиц происходит усиление влияния фракционного состава ТВЧ.

В диссертационном исследовании Барсковой Л.С. впервые установлены особенности реагирования тиолдисульфидного звена антиоксидантной системы альвеолярных макрофагов на воздействие модельных взвесей с различным дисперсным составом микрочастиц. Впервые показано, что повышение содержания тиоредоксина, в ответ на развитие окислительного стресса в альвеолярных макрофагах, обусловлено увеличением количества твердых частиц мелкодисперсных фракций, в наибольшей степени с размерностью от 1,0 до 2,5 мкм.

В экспериментальных исследованиях на культуре макрофагов бронхоальвеолярного лаважа крыс линии Вистар *in vitro* выделены индикаторы раннего токсического повреждения клеток при воздействии твердых взвешенных частиц. Определено, что протеин карбонил проявляет наибольший отклик на частицы размерностью от 0,1 до 1,0 мкм, а 8-ОХДГ – от 2,5 до 10,0 мкм.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные в диссертационном исследовании Барсковой Л.С. результаты значимы, как для теоретической, так и практической медицины.

Диссертация вносит существенный вклад в установление молекулярных механизмов развития окислительного стресса в альвеолярных макрофагах экспериментальных животных, в частности после воздействия различных по дисперсности твердых частиц. Доказано, что ответная реакция клетки

обусловлена содержанием микрочастиц, фагоцитируемых альвеолярными макрофагами и индуцирующих образование активных форм кислорода. Анализ полученных данных позволил автору констатировать, что при увеличении доли мелкодисперсных фракций усиливается влияние фракционного состава твердых взвешенных частиц.

Диссертантом доказана интенсификация окислительного стресса в альвеолярных макрофагах при увеличении количества мелкодисперсных частиц, что расширяет представления об окислительном стрессе, как патологическом процессе, лежащем в основе заболеваний органов дыхания воспалительного генеза, вызываемых неблагоприятными экологическими факторами.

Значимым является доказательство важной роли тиоредоксина в антиоксидантном ответе клетки. Значительное увеличение концентрации тиоредоксина происходит при возрастании содержания воздействующих твердых частиц в диапазонах размерности, поглощаемых альвеолярными макрофагами. Усиление выработки тиоредоксина обеспечивает адекватный антиоксидантный ответ и защиту альвеолярных макрофагов посредством редокс-регуляции, репаративного действия, предотвращения апоптотической гибели клетки и хемотаксической активности.

В диссертационном исследовании результативно использованы экспериментальные методики получения, культивирования и нагрузки альвеолярных макрофагов модельными взвесями микрочастиц. Адекватно подобран комплекс методов исследования, направленных на установление патофизиологических механизмов нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза альвеолярных макрофагов при воздействии твердых взвешенных частиц различной дисперсности.

Автором предложены критерии ранней диагностики окислительного повреждения клетки в результате воздействия мелкодисперсных фракций твердых взвешенных частиц атмосферного воздуха, наиболее информативными являются протеин карбонил и 8-ОХДГ. Практическую

значимость имеет определение фракционного состава приземного слоя атмосферного воздуха территорий, различающихся по уровню техногенной нагрузки, с целью выделения наиболее значимых диапазонов размерности и определения их содержания в окружающем воздухе. Для определения дисперсности взвешенных частиц разработана методика отбора проб атмосферного воздуха в приземном слое, оказывающем непосредственное влияние на органы дыхания.

Полученные автором результаты исследования могут быть использованы при изучении этиологии и патогенеза заболеваний, связанных с техногенным загрязнением атмосферного воздуха населенных территорий. Эти данные могут послужить основой для разработки патогенетически обоснованных способов профилактики и коррекции заболеваний органов дыхания, вызываемых неблагоприятными экологическими факторами.

Представлены 3 методических документа: по методологии экспериментального исследования воздействия микроразмерных частиц на альвеолярные макрофаги, методу отбора и анализа проб атмосферного воздуха, методике системного моделирования экологической зависимости заболеваний органов дыхания. Методические документы внедрены в учебный процесс кафедры клеточной биологии и генетики ШЕН ДВФУ и Учебного центра Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИИМКВЛ. Материалы и выводы диссертации защищены 4 свидетельствами о государственной регистрации патентных продуктов Российской Федерации.

**Достоверность полученных результатов. Оценка содержания диссертации, ее завершенности, замечания по оформлению работы**

Достоверность и обоснованность сформулированных научных положений и выводов подтверждены высоким научно-методическим уровнем выполнения диссертационной работы. Работа выполнена на достаточном экспериментальном материале, сформированы группы сравнения. Результаты исследования получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимы в различных условиях. Автором проведен всесторонний



статистический анализ полученных данных с использованием современных программных продуктов. В целом, диссертационная работа Барсковой Л.С. соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформой, взаимосвязью выводов и поставленных задач.

Диссертационная работа изложена на 127 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора зарубежной и отечественной литературы, материалов и методов, собственных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 21 таблицей и 9 рисунками, процитирована 171 публикация отечественных и зарубежных авторов.

Глава «Введение» традиционно раскрывает актуальность темы диссертационного исследования, обозначены цель и задачи, представлены научная новизна и значимость для теоретической и практической медицины, даны выносимые на защиту основные научные положения.

Глава «Обзор литературы» посвящена анализу опубликованных работ зарубежных и отечественных исследователей по теме диссертации, что позволило автору аргументировать необходимость изучения нарушений окислительно-восстановительного гомеостаза альвеолярных макрофагов как ответной реакции на воздействие различных по дисперсности твердых взвешенных частиц.

Глава «Материалы и методы» дает полное представление о проведенных этапах исследования. С методологической точки зрения работа построена верно, в основу положены экспериментальные исследования и углубленное изучение ряда окислительных и восстановительных параметров на молекулярном уровне. Сравнительные данные получены при изучении групп альвеолярных макрофагов, подвергнутых воздействию различных по дисперсному составу модельных взвесей твердых частиц, на достаточном количестве наблюдений. Лабораторные исследования проведены на

современном оборудовании, обеспечивающем высокую точность полученных результатов.

В главе «Результаты исследований» приводятся данные по оценке фракционного состава твердых микрочастиц, взвешенных в приземном слое атмосферного воздуха г. Владивостока в двух различных по техногенному прессингу районах. Проведен анализ содержания частиц и выделены диапазоны размерности в зависимости от области оседания в органах дыхания, возможных механизмов элиминации и патологического воздействия. На основе полученных результатов сформированы модельные взвеси частиц, использованные для нагрузки альвеолярных макрофагов. Во втором разделе главы описаны особенности прооксидантных процессов, проходящих в группах сравнения при нагрузке модельными взвесями. Проведенный анализ позволил автору охарактеризовать различия в окислительных повреждениях биомолекул и мембранных структур клетки в зависимости от дисперсности входящих в состав модельных взвесей твердых микрочастиц. Третий раздел главы характеризует параметры ответной реакции системы антиоксидантной защиты. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении в данный процесс и репаративных механизмов. В последнем разделе главы показана взаимосвязь показателей прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза альвеолярных макрофагов с характеристиками модельных взвесей, определены основные тенденции в реакции клетки на повреждающий фактор на основе статистически значимых корреляционных зависимостей. Выделенные биохимические маркеры могут быть использованы в качестве ранних критериев повреждения клеток при мониторинге воздействия микроразмерных твердых взвешенных частиц.

В главе «Обсуждение результатов исследования» рассматривается развитие окислительно-восстановительного дисбаланса в альвеолярных макрофагах при воздействии микрочастиц различной дисперсности с учетом выявленных взаимосвязей. Глава завершается обобщающим заключением, что существенно улучшает восприятие представленной информации.

Выводы соответствуют поставленным задачам и полностью отражают результаты выполненного исследования. Библиографический список использованных источников литературы составлен корректно. По материалам диссертационного исследования опубликована 31 печатная работа, из них 5 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Следует отметить, что в списке работ автора 2 статьи изданы в журналах, индексируемых в международных базах цитирования.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Результаты и выводы диссертационной работы целесообразно использовать в работе научно-исследовательских коллективов НИИ и ВУЗов, изучающих вопросы развития экологозависимых заболеваний, а также занимающихся разработкой методов профилактики нарушений здоровья в результате воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Материалы диссертации могут быть рекомендованы к внедрению в учебный процесс профильных кафедр ВУЗов (патологическая физиология, клеточная биология, общая и коммунальная гигиена, экология).

Автореферат написан хорошим литературным языком и содержит достаточное количество иллюстративного материала, что облегчает восприятие материала. Автореферат отражает все необходимые разделы диссертации и основные научные положения, оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями.

Замечаний принципиального характера по представленной к защите диссертационной работе нет. Тем не менее, имеются вопросы уточняющего характера:

1. С какой целью в исследовании для определения окислительно-восстановительных показателей использовалась культура клеток и культуральная среда?
2. Почему в исследование антиоксидантной системы был включен тиоредоксин?



При этом уточнения не влияют на высокую научную значимость и практическую ценность результатов исследования и общую положительную оценку диссертации.

### **Заключение.**

Таким образом, диссертация Барсковой Людмилы Сергеевны «Патофизиологические механизмы нарушения прооксидантно-антиоксидантных процессов в альвеолярных макрофагах крыс линии Вистар при воздействии твердых взвешенных частиц различной дисперсности», является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, направленной на изучение молекулярных механизмов развития окислительного стресса в альвеолярных макрофагах на воздействие твердых микрочастиц, имеющей существенное значение для развития патологической физиологии, что соответствует требованиям к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ № 1168 от 01.10.2018 и № 751 от 26.05.2020), а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология.

### **Официальный оппонент:**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник  
лаборатории патофизиологии ФГБНУ «Научный центр  
проблем здоровья семьи и репродукции человека»

М.А. Даренская

«4» марта 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»  
Министерства науки и высшего образования России  
Адрес: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16  
Тел: +7 (3952) 20-76-36, Сайт: <https://health-family.ru>

Подпись д-ра биол. наук М.А. Даренской  
заверяю, начальник отдела кадров  
«4» марта 2021 г.

О.Н. Макарова