

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Сяткина Сергея Павловича на диссертацию Соловьевой Анны Геннадьевны на тему: «Состояние и особенности регуляции оксидоредуктаз системы биотрансформации при термической травме и в условиях воздействия активными формами кислорода и азота», представленную к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Актуальность избранной темы

Актуальность темы диссертационного исследования Соловьевой А.Г. обусловлена, прежде всего, высокой социальной значимостью изучаемой проблемы, поскольку термическая травма (ТТ) является одним из наиболее распространенных видов бытового травматизма, в том числе, в условиях обострения военной обстановки. При этом сочетание ожога с термоингаляционным поражением отягощает течение ТТ, вызывая развитие легочных осложнений вплоть до летального исхода. Поэтому исследование механизмов функционально-биохимической перестройки организма, получившего комбинированную термическую травму, разработка методов, позволяющих повысить устойчивость организма к развивающейся ожоговой болезни, является важной медико-биологической проблемой.

Кроме того, до сих пор не разработаны биохимические прогностические и диагностические критерии развития ранних осложнений при ТТ. А проблема изучения молекулярных механизмов нарушения окислительного и энергетического метаболизма клеток и тканей при термической травме остается одной из важных проблем современной комбустиологии, решение которой невозможно без фундаментальных биохимических и физиологических исследований развития ожоговой болезни. Хорошо известно, что термическая травма приводит к интенсификации свободнорадикальных процессов и увеличению содержания

высокотоксических соединений. Ведущая роль в механизмах их биотрансформации принадлежит ферментам антиоксидантной защиты и немикросомального окисления. Поэтому исследование роли оксидоредуктаз системы биотрансформации в формировании окислительного и карбонильного стресса при ТТ является актуальной темой в изучении проблем возникновения эндогенной интоксикации и гипоксии.

В настоящее время продолжается интенсивный поиск путей метаболической коррекции ожоговой болезни. В связи с этим совершенно оправданным можно считать исследование автором влияния активных форм кислорода и азота на активность оксидоредуктаз при ожоге. Несмотря на большое количество работ, роль NO в системной регуляции гомеостаза клеток и тканей до сих пор вызывает научные дискуссии, а выявление биохимических механизмов действия NO требует дальнейшего анализа с целью обоснования возможности и практической целесообразности их фармакологической регуляции. Перспективными, но малоизученными остаются последствия ингаляции синглетного кислорода в условиях гипоксии. Это также подтверждает значимость диссертационного исследования Соловьевой А.Г.

Данная работа посвящена изучению роли оксидоредуктаз антиоксидантной защиты и немикросомального окисления системы биотрансформации в энзиматических механизмах регуляции метаболической адаптации организма. Воздействию активных форм кислорода и азота в норме и при ТТ на эти системы. Разработке на основе полученных результатов оптимальных схем использования активных форм кислорода и азота. Это может стать биохимической основой для обоснования эффективных методов лечения ТТ с учетом её тяжести и площади поражения. С этих позиций изучение особенностей окислительного и энергетического метаболизма, лежащих в основе нарушения функций органов и систем при ожоговой болезни, и их взаимосвязи с активностью

оксидоредуктаз можно рассматривать в качестве важной и актуальной научной проблемой, как с научной, так и с практической точки зрения.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Научные положения и выводы диссертационной работы Соловьевой А.Г. отличаются высокой степенью обоснованности и основательной аргументацией. Это подтверждается достаточным объёмом фактического материала (482 крысы, 55 образцов крови больных с термической травмой и 52 образца крови здоровых доноров, общее количество анализов составило 82572). Выполнена статистическая обработка данных. Проведено квалифицированное обсуждение полученных результатов.

Логична этапная организация исследования. Тщательно продуман протокол классических и современных методов работы. Использован широкий диапазон экспериментальных, инструментальных, физико-химических, морфологических, биохимических современных методов анализа. Выбранные методы адекватны поставленным задачам.

Достоверность и новизна научных положений и выводов

Поставленные в работе задачи и способы их решения основаны на современных положениях комбустииологии и современных биохимических методах. Проведено глубокое изучение работ отечественных и зарубежных учёных, посвящённых анализу молекулярных механизмов развития ожоговой болезни и выявлению ранних биохимических маркеров нарушения окислительного и энергетического метаболизма при термической травме.

Была исследована необходимая и достаточная выборка образцов биологического материала. Дизайн исследования адекватен цели и задачам. Используются контрольные группы и группы сравнения. Применены корректные методы статистической обработки полученных данных. Все это в совокупности делает результаты и выводы диссертационного исследования достоверными.

Автором впервые определены особенности ингибирования оксидоредуктаз в крови и субклеточных фракциях органов при ТТ. Изучены закономерности функционирования альдегиддегидрогеназы в крови и в органах при ТТ. Так, фермент находится в эритроцитах в трех надмолекулярных формах (матриксная, лабильно- и прочносвязанная с мембраной). Наибольшую активность проявляет при использовании в качестве субстратов салицилового и глутарового альдегидов. Выявлена приобретенная энзимопатия альдегиддегидрогеназы, после термической травмы. Об этом свидетельствовал дефицит фермента спустя 6 месяцев, после ожога, в I и II поколениях крыс с ожогом.

В опытах *In vitro*, *in vivo* и в условиях хронического эксперимента впервые показаны молекулярные механизмы регуляции активности ферментов немикросомального окисления и антиоксидантной защиты под влиянием физико-химических факторов (NO, динитрозильные комплексы железа, синглетный кислород). Направление и эффективность действия этих факторов зависят от концентраций активных форм кислорода или азота. Имеют органоспецифический характер.

Впервые автором выявлены оптимальные биохимические сдвиги энергетического и окислительного метаболизма в крови. При этом использовали ингаляции NO в концентрации 20 ppm, ингаляции синглетного кислорода (мощность генератора 100%) и динитрозильные комплексы железа в концентрации 0,3 мкмоль/л. Продолжительность процедур в 10 дней можно считать терапевтическими для коррекции гипоксических расстройств и нарушений активности ферментов биотрансформации при комбинированной термической травме.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Результаты диссертационной работы Соловьевой А.Г. имеют значение для биологии, медицинской науки и практического здравоохранения.

Полученные Соловьевой А.Г. данные углубляют представления о роли оксидоредуктаз антиоксидантной защиты и немикросомального окисления

системы биотрансформации в молекулярно-биохимических механизмах метаболической адаптации организма при комбинированной термической травме, а также об особенностях их регуляции под воздействием активных форм кислорода и азота. Эта информация имеет большое значение для разработки инновационных лечебных технологий, основанных на терапии активными формами кислорода и азота, которые могут быть применены при многих патологических состояниях, сопровождающихся окислительным стрессом и энергодефицитом.

Значимость результатов исследования состоит в том, что автором разработана и экспериментально обоснована новая научная концепция участия оксидоредуктаз немикросомального окисления и антиоксидантной защиты в формировании окислительного, карбонильного и нитрозативного стресса при комбинированной термической травме. Показано, что это обусловлено особенностями регуляции оксидоредуктаз, зависит от типа ткани или органа и сроков, после ожога.

По результатам исследования внедрены способы диагностики детоксикационной функции печени при ожогах в эксперименте, предложены оценки степени тяжести синдрома эндогенной интоксикации у больных с термической травмой, оценки динамики метаболизма в крови у больных с термической травмой. Разработанные устройства для насыщения крови газами, для обеспечения регенерации повреждений кожных покровов в эксперименте и для экспериментального моделирования термической травмы кожи нашли практическое применение в экспериментальной биологии и медицине.

Характеристика содержания диссертации

Диссертация Соловьевой А.Г. написана по общепринятой форме. Она изложена на 465 страницах машинописного текста. Содержит традиционные разделы в виде введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Разделы связаны

логикой изложения, которая последовательно подводит читателя к заключению и полученным выводам.

Во введении приведены актуальность выбранной темы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, сведения об апробации результатов, публикациях и изобретениях, объёме и структуре диссертации, личном вкладе соискателя. Знакомство с введением позволяет получить общее представление о работе.

В обзоре литературы представлены данные о биохимических аспектах системы биотрансформации в тканях и органах. Приводится характеристика ферментов антиоксидантной защиты, немикросомальной системы биотрансформации и энергетического метаболизма в клетках и тканях. Детально изложены молекулярные и клеточные механизмы действия активных форм кислорода и азота на биосистемы.

В главе материалы и методы подробно описаны постановка экспериментов и используемые методы исследования. Работа состояла из экспериментальной и клинической части. Автор системно представил распределение общего количества материала по группам. Все эксперименты выполнены на основе правил надлежащей лабораторной практики. Протоколы опытов с участием животных и людей одобрены и утверждены Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

Собственные исследования, несмотря на многочисленные экспериментальные результаты, изложены доступно, таблицы содержат всю необходимую информацию, которая в полной мере отражает математический анализ полученных данных.

Для обоснования возможности коррекции активности оксидоредуктаз активными формами кислорода и азота проведен эксперимент *in vitro* на консервированной донорской крови.

Автор провёл частичную очистку альдегиддегидрогеназы печени крыс, включающую фракционирование фермента сульфатом аммония, гель-

фильтрацию на сефадексе G-25, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе с последующей оценкой каталитических и кинетических свойств фермента. Это позволило получить представление об особенностях функционирования альдегиддегидрогеназы при ТТ и ее роли в формировании карбонильного стресса при ожоговой болезни. Эксперименты с ингибитором альдегиддегидрогеназы, тетурамом, позволили автору выявить механизм действия оксида азота на активность фермента.

В главе «результаты исследования и их обсуждение» диссертант приводит и анализирует результаты своих исследований с привлечением данных других авторов в этой области исследования. Анализ фактического материала выполнен основательно. Очевидна научная эрудиция автора, позволившая последовательно изложить и увязать в единое целое большую совокупность полученных результатов и обобщить их в виде наглядного материала. Особо следует отметить полученные автором данные о воздействии подобранного курса ингаляций синглетного кислорода на окислительно-восстановительный баланс крови больных с комбинированной термической травмой продолжительностью 10 дней при 100% мощности генератора синглетного кислорода. При этом нормализовались концентрация лактата, общая антиоксидантная активность, повысилась активность альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и коэффициент баланса энергетических реакций, уменьшился уровень малонового диальдегида в плазме. Возросла активность супероксиддисмутазы и каталазы за счет роста их сродства к субстратам реакции, максимальной скорости накопления продукта реакции и их каталитической эффективности. Это может представлять дополнительный интерес для саногенетического и терапевтического использования синглетного кислорода в практической комбустиологии.

В заключении автор обобщает результаты, полученные в ходе диссертационного исследования. Выводы исследования структурированы и соответствуют поставленным задачам.

Диссертация написана хорошим литературным языком, читается с большим интересом, демонстрирует способность автора к анализу и обобщению результатов.

По теме диссертации опубликовано 88 работ, из них 51 – в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК Минобрнауки РФ, 2 монографии, получено 6 патентов РФ. Опубликованные статьи содержат материалы диссертации. Противоречий между текстом диссертационного исследования и опубликованными работами не отмечается.

Положительной стороной работы может быть широкая апробация основных положений данного исследования на международных и всероссийских конференциях.

Автором выполнено масштабное исследование, имеющее высокую научную и практическую значимость. Поставленная цель и задачи полностью решены. Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертации не имею. В порядке обсуждения хотелось бы задать автору следующие вопросы:

- в клинической части Вашей работы рассмотрено влияние только одной активной формы кислорода, синглетного кислорода, на активность оксидоредуктаз системы биотрансформации при термической травме. Планируется ли изучение влияния активных форм азота на исследуемые показатели у пациентов с ожогом?

- Возможно ли использование исследуемых оксидоредуктаз в качестве энзимотерапевтических препаратов в плане профилактики осложнений при термическом поражении?

Заключение

Таким образом, диссертацию Соловьевой Анны Геннадьевны «Состояние и особенности регуляции оксидоредуктаз системы биотрансформации при термической травме и в условиях воздействия активными формами кислорода и азота», представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук, можно признать законченным в рамках поставленных задач научным трудом, в котором на основании выполненного автором

комплекса исследований разработана и экспериментально обоснована новая научная концепция, позволяющая выявить качественно новые закономерности в развитии перспективного направления в области биохимии термической травмы и комбустиологии.

В совокупности актуальность темы, высокий методический уровень, новизна полученных результатов, теоретическая и практическая значимость диссертации позволяют считать, что она соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г.). Соловьева Анна Геннадьевна как автор этой диссертации заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биологической химии имени академика Т.Т. Березова медицинского факультета медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

С.П. Сяткин

117435, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

Тел.: 8-495-434-35-05,

e-mail: syata@mail.ru

Личную подпись С.П. Сяткина удостоверяю

Ученый секретарь ученого совета

медицинского института РУДН

к.фарм.н., доцент



Т.В. Максимова

03.12.2020