

ОТЗЫВ официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Зарипова Павла Ильдаровича на тему: «Механизмы редокс-регуляции при адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям» по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки).

Актуальность избранной темы

Диссертационное исследование Зарипова П.И. связано с изучением редокс-статуса эритроцитов в норме и при адаптации к физиологическим стрессовым воздействиям.

Стрессовые воздействия могут вызывать нарушения окислительно-восстановительных процессов в эритроцитах и тем самым приводить к увеличению активных форм кислорода, а следовательно, к снижению функциональной активности эритроцитов. Развитие окислительного стресса в клетках может быть обусловлено первичными стрессовыми воздействиями: перемещаясь по кровотоку, эритроциты сталкиваются с гипоксией (дефицитом O_2), испытывают метаболический, осмотический и механический стрессы.

Важным звеном антиоксидантной защиты эритроцитов является глутатион (GSH). Способность гемоглобина (Hb) и других белков ковалентно связывать глутатион (глутатионилирование) под действием стрессов до настоящего момента было изучено крайне слабо. Установление механизмов, лежащих в основе адаптации клеток, и роли взаимодействия глутатиона с Hb в этих процессах, позволят глубже понять причины нарушения функциональной активности эритроцитов. Полученные результаты могут быть использованы в разработке новых подходов к лечению ряда заболеваний. Особенно важно это для решения такой научной и социально-экономической задачи современного здравоохранения, как длительное хранение донорской эритроцитарной взвеси, в процессе которого эритроциты испытывают именно те стрессы, которые изучает автор в своих модельных экспериментах.

Проблема научного исследования, проведенного Зариповым П.И., безусловно актуальная.

Степень обоснованности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Надлежащая степень обоснованности положений, выносимых на защиту, и

научных выводов в диссертации Зарипова П.И. подтверждается использованием современной методологии, включающей планирование эксперимента, применение современных экспериментальных биофизических, биохимических методов исследования, статистического анализа. Сформулированные в диссертации выводы и положения находятся в полном соответствии с целью и задачами работы и основаны на оригинальных данных, собранных и проанализированных автором. Логичность и последовательность исследования, а также использование исчерпывающего объема экспериментальных данных обеспечивают надежность полученных результатов.

Научная новизна выполненной работы заключается в том, что впервые показана способность Hb депонировать GSH в модельных условиях стресса, соответствующих характерным физиологическим стрессовым воздействиям, установлена роль глутатионилирования Hb при адаптации эритроцитов.

Достоверность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Все полученные автором результаты воспроизводимы, использованные методы работы и дизайн всего исследования описаны подробно и понятно. Достоверность подтверждается опубликованием результатов работы в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах. Основные положения, результаты и выводы диссертации опубликованы в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки).

Результаты диссертации широко обсуждались в докладах Зарипова П.И. на научных конференциях. Результаты работы прошли всестороннюю апробацию и получили широкое признание научного сообщества. Полученные данные могут использоваться для выработки подходов на молекулярно-клеточном уровне для снижения интенсивности патологических процессов (например, при серповидно-клеточной анемии и болезни Альцгеймера). Результаты работы могут быть рекомендованы при разработке подходов для увеличения времени длительного хранения эритроцитов донорской крови при сохранении их качества.

Диссертационное исследование Зарипова П.И. выполнено на стыке двух дисциплин и демонстрирует интеграцию экспериментальных и теоретических биофизических методов анализа с фундаментальными концепциями физиологии. Содержание оппонируемой диссертации соответствует специальности 1.5.2. Биофизика, а именно следующим ее направлениям: биофизика клетки и

клеточных мембран (структура мембран эритроцитов, проницаемость, транспорт), медицинская биофизика (молекулярные механизмы патогенеза и оксидативного стресса). Также содержание оппонируемой диссертации соответствует специальности 1.5.5. Физиология человека и животных, а именно следующим ее направлениям: исследования регуляторных механизмов адаптации клеток крови к экстремальным и стрессовым факторам среды, закономерности функционирования системы крови при различных состояниях организма, биологические науки.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Зарипова П.И. построена по традиционному плану и состоит из следующих частей: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы. Материал изложен на 150 страницах, включает 2 таблицы и 55 рисунков. Список литературы содержит 312 источников.

В целом, диссертация Зарипова П.И. является целостным междисциплинарным исследованием, успешно сочетающим подходы биофизики и физиологии. Работа оставляет положительное впечатление, характеризуется хорошим оформлением, изложена ясным научным языком. Представленная к защите диссертационная работа выполнена на высоком научном уровне.

В целях более полного раскрытия некоторых аспектов исследования считаю целесообразным привести следующие замечания и вопросы.

1. В диссертации следовало сформулировать, какие общие базовые критерии были выбраны для количественного обоснования стрессовых величин для каждой экспериментальной модели стресса. Почему в качестве модели гипоксии было выбрано pO_2 1 кПа?
2. В диссертации отмечено, что в условиях гипоксии, а также при недостатке глюкозы *in vitro* сами по себе эритроциты не продуцируют активные формы кислорода (АФК). Это утверждение мне представляется дискуссионным. Возможны и иные причины данного факта отсутствия изменений:

Первая – специфика детектирования различных АФК. Некоторые зонды, методы чувствительны только к конкретным формам, например, только к перекиси водорода или только к супероксид-анион радикалу. И поэтому могли быть зарегистрированы только определенные АФК и не зафиксированы другие.

Вторая – возможно АФК вырабатывались, но мощная внутренняя антиоксидантная система эритроцитов (каталаза, глутатион) их эффективно нейтрализовала.

3. В работе показано, что стресс по кислороду, по глюкозе, по осмолярности не ведет к изменению АФК, а при механическом воздействии и при кратком центрифугировании окислительный стресс в эритроцитах развивается. В чем биофизическая причина разных результатов при этих воздействиях?
4. В исследованиях время инкубации эритроцитов в условиях разных видов стрессов было не одинаковым: пониженный кислород – 3 часа, низкая глюкоза – 24 часа, пониженная осмолярность 1 мин, механические напряжения порядка минуты. Чем обусловлен выбор именно этих времен? Можно ли предположить возможность других результатов, если изменить характерные времена воздействия разных видов стрессов?
5. В работе было бы желательно привести оптические спектры исследуемых растворов. Чем обусловлен уровень $\sim 0,35$ на длине волны ~ 625 нм (рис. 48)?

Редакционные замечания:

В работе часто встречаются качественные формулировки при сравнении величин, например ... высвободить *значительный пул GSH*, ... эритроциты сильно увеличиваются в объеме, ... после длительного периода адаптации, ... рост Ca^{2+} менее выраженный и др. и при этом не приводятся количественные оценки.

На Рис. 7 автореферата представлена модель докинга, при этом не указана ссылка. В подписи к Рис. 10 автореферата отсутствует описание к пунктам в, г.

Указанные выше замечания не носят принципиального характера и не умаляют значимости диссертационного исследования.

Заключение

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное

исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Зарипов Павел Ильдарович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры медицинской и биологической физики, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Козлова Еле

Контактные

тел.: +7(926)

e-mail: waterlake@mail.ru

Специальность по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 01.04.16 – Физика атомного ядра и элементарных частиц (физико-математические науки)

Адрес места работы: 119048, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра медицинской и биологической физики.

Тел.: +7 (499) 367-18-72;

e-mail: kozlova_e_k@staff.sechenov.ru