

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор -
проректор по научной работе
ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов»
д.м.н., профессор,
член-корреспондент РАН

А. А. Костин



«30» марта 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» о значимости диссертационной работы Козина Станислава Владимировича на тему «Влияние изотопного D/H обмена на ткани головного мозга крыс при действии стрессовых факторов», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Козина С.В. посвящена актуальной задаче – исследованию влияния изотопного замещения дейтерия на протий в организме лабораторных животных на функциональные показатели головного мозга при действии стрессовых факторов и в их отсутствии.

Несмотря на развитие медико-биологических наук, все же остаётся актуальным разработка эффективных и безопасных способов повышения резистентности организма с целью предотвращения развития нейродегенеративных заболеваний, а также средств, снижающих функциональные расстройства ЦНС на фоне нейропатологий. На сегодняшний день известно, что незначительное колебание изотопных соотношений дейтерия и протия в жидких средах и тканях организма повышает их резистентность к таким повреждающим факторам как,

ионизирующее излучение и тяжелые металлы, предотвращает развитие метаболических нарушений и интоксикаций организма, проявляя антиоксидантный и цитопротекторный эффект.

Характеристика диссертационной работы по главам

Структура диссертационной работы Козина С.В. стандартна и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части и обсуждения результатов (2 и 3 главы), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, состоящего из 257 источников. Иллюстративный материал содержит 17 рисунков и 6 таблиц.

Во введении диссертационной работы обосновывается актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, определяются цель и задачи проводимого исследования.

Обзор литературы содержит тщательный анализ современных литературных данных, касающихся вопросов биологических эффектов низких концентраций дейтерия в организме млекопитающих, приведены экспериментальные данные исследований *in vitro* и *in vivo*. Подробно описаны механизмы адаптационного ответа организма млекопитающих на действие стрессовых факторов, а также рассмотрены патофизиологические механизмы в головном мозге на фоне гипоксических воздействий.

Во второй главе представлена методическая часть работы. Автором используются биохимические, поведенческие и инструментальные методы исследования, а также методики работы с культурой ткани. Схемы эксперимента и методы описаны достаточно подробно, поэтому они могут быть легко воспроизведены. Экспериментальная часть работы выполнена на высоком научно-методическом уровне. Представление экспериментальных данных логично вытекает из целей и задач исследования.

В третьей главе представлен широкий спектр экспериментальных данных.

Вначале автор представляет результаты ЯМР и масс-спектрометрических исследований, отражающих изменение концентрации

дейтерия в крови и тканях головного мозга лабораторных крыс. Было установлено, что питьевой рацион с содержанием дейтерия 50 ppm достоверно приводил к постепенному снижению концентрации дейтерия в крови и тканях головного мозга, что по предположению автора, объясняется изотопным обменом дейтерия на протий в молекулах белков, липидов и нуклеиновых кислот, входящих в состав клеток крови и тканей.

Следующие два раздела содержат результаты биохимических исследований, характеризующих антиоксидантный статус тканей головного мозга. Было установлено, что изотопный обмен дейтерия на протий в тканях головного мозга лабораторных животных на фоне продолжительного питьевого рациона с концентрацией дейтерия 50 ppm оказывал антиоксидантный эффект после перенесённой острой гипоксии, тогда как, D/H обмен на фоне непродолжительного приема обедненной дейтерием воды вызывал прооксидантный эффект. Данный эффект автор объясняет развитием умеренной стрессовой реакции в ответ на снижение концентрации дейтерия в организме на начальных сроках применения изотопномодифицированного питьевого рациона и включением компенсаторных механизмов, приводящих к появлению перекрестной адаптации на более поздних сроках применения обеднённого дейтерием питьевого рациона.

Следом автор описывает влияние D/H обмена в тканях головного мозга на когнитивные и эмоциональные показатели лабораторных животных. Было установлено, что снижение содержания дейтерия в организме крыс на фоне продолжительного легкоизотопного питьевого рациона способствовало улучшению выполнения условно рефлекторной реакции в T-образном лабиринте после перенесенной острой гипоксии, а также снижению тревожного поведения при нормоксии в приподнятом крестообразном лабиринте. Данный эффект автор объясняет снижением интенсивности окислительного стресса после острой гипоксии на фоне изотопного обмена. Благодаря этому процесс перекисного окисления в тканях головного мозга

проходил с меньшим повреждением цитоплазматических мембран нейронов и минимальным нарушением работы мембранных транспортёров, и ионных каналов, сохраняя тем самым интегративную целостность ЦНС.

Следующий раздел посвящен изучению низких концентраций дейтерия среды на функциональные показатели клеток нервной системы на экспериментальных моделях *in vitro*. Изотопный обмен в нейронах мозжечка приводил к развитию умеренного стресса и изменению некоторых физико-химических параметров нервных клеток. Было показано, что инкубация нейронов мозжечка в инкубационной среде, в которой концентрация дейтерия снижена относительно природного уровня, способствовала усилению действия внешних стрессовых факторов, таких как температурный стресс и глюкозное голодание. Экспериментально показан факт снижения мембранного потенциала митохондрий, снижения концентрации внутриклеточных ионов кальция и активных форм кислорода в цитозоле нейронов, а также уменьшения электрической активности нейронов гиппокампа.

В заключительном разделе третьей главы автор проводит экспериментальное изучение влияния низких концентраций дейтерия на активность и структуру фермента. Было показано, что понижение концентрации дейтерия в реакционной среде способствовало уменьшению скорости пероксидазного окисления о-дианизидина пероксидом водорода и увеличению константы Михаэлиса для данной реакции. На другой модельной системе автор установил, что низкоизотопная среда уменьшала скорость пероксидазного окисления люминола пероксидом водорода. Несмотря на положительные результаты в изучении кинетики данного фермента не удалось установить влияния данных концентраций дейтерия на вторичную структуру белка и его активной центр, что дало бы объяснение выше изложенным процессам. Однако, есть результаты исследований собственной флуоресценции пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина, из которых видно, что при добавлении данных белков в

изотопномодифицированную среду происходит уменьшение интенсивности триптофановой и совместной триптофановотирозиновой флуоресценции. Данной явление автор объяснил усилением подвижности соседних аминокислотных радикалов, окружающих тирозиновые и триптофановые остатки, находящиеся вблизи поверхности белка, приводящие к возрастанию вероятности переноса энергии с хромофоров на функциональные группы соседних акцепторов. Этот процесс, как полагает автор, возник за счет уменьшения энергии водородных связей между функциональными группами аминокислотных остатков и гидратной оболочкой, а также уменьшения энергии водородных связей внутри самой молекулы.

Экспериментальные данные, полученные в последних трех разделах, были положены в основу механизмов влияния изотопного D/H обмена на ткани головного мозга в экспериментах *in vivo*. Автор полагает, что изотопный обмен в ферментах и транспортерах, приводит к изменению кинетических свойств белков и сказывается на работе внутриклеточных органелл, в первую очередь митохондрий. Изменение кинетико-термодинамических параметров белков-переносчиков и ферментов в электрон-транспортной цепи митохондрий приводит к уменьшению мембранного потенциала митохондрий и, как следствие, нарушению синтеза макроэргических соединений, вызывая в организме стрессовую реакцию.

Все выводы, сформулированные автором, достоверны и логично следуют из полученных им результатов.

В заключении сформулированы основные результаты, полученные в ходе работы над диссертационным исследованием.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Автором было показано, что изотопный обмен дейтерия на протий в тканях головного мозга на фоне продолжительного применения низко дейтериевого питьевого рациона оказывает антигипоксический эффект.

Автором получены экспериментальные данные о влиянии низких концентраций дейтерия на культуру нейронов мозжечка. Впервые автор

показал действие низких концентраций среды на каталитические функции пероксидазы хрена в двух модельных системах.

Научная ценность работы состоит в изучении физико-химических механизмов, необходимых для понимания реализации защитных эффектов изотопного D/H обмена в организме млекопитающих при действии повреждающих факторов.

Практическая значимость результатов работы о воздействии направленного изотопного обмена дейтерия на протий в тканях головного мозга на интенсивность окислительных процессов и антиоксидантный статус тканей головного мозга крыс, а также на когнитивные функции животных в условиях гипоксии при продолжительном легкоизотопном рационе свидетельствуют о возможном применении модификации изотопного состава среды организма для повышения его резистентности. Это дает основание использовать обедненный дейтерием питьевой рацион в качестве профилактического средства в развитии нейродегенеративных процессов, сопровождающихся оксидативным стрессом и функциональными расстройствами центральной нервной системы. По результатам экспериментальной работы был получен патент «Способ профилактики и коррекции метаболических и функциональных нарушений центральной нервной системы в условиях стресса» (№271707).

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов достигается корректностью поставленных задач, использованием современных материалов и методов в ходе работы, проведенными экспериментальными исследованиями, а также сравнением полученных данных с известными результатами, опубликованными отечественными и зарубежными авторами. Достоверность и обоснованность полученных результатов также подтверждается тем, что они были доложены на международных и всероссийских конференциях и опубликованы в рецензируемых научных изданиях.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Основные научные и практические результаты диссертационной работы могут быть рекомендованы для использования в санаторно-курортной зоне Краснодарского края, а также при исследовании влияния стабильных изотопов на живые системы в ЮФУ (Ростов-на-Дону), ИОФ РАН (Москва), ЮНЦ РАН (Ростов-на-Дону), ФНЦ «Пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (Москва), РУДН (Москва), Оренбургский государственный университет, Иркутский государственный университет, а также в других научных и образовательных учреждениях.

Полнота опубликованных научных результатов и апробация

Результаты данного диссертационного исследования опубликованы в научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и Web of Science и рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации (7 статей), всего по теме исследования опубликовано 14 работ. Все материалы диссертационного исследования полностью отражены в опубликованных работах. Результаты диссертационной работы прошли апробацию на пяти международных и всероссийских конференциях.

Замечания по диссертационной работе

1. Автором не указываются причины, по которым рассматривается только изотопный обмен на фоне двух и шестинедельного срока воздействия обеднённой дейтерием воды, кроме того, следовало бы обосновать, почему в работе рассматривается только влияние одной концентрации дейтерия.
2. В работе рассматриваются процессы, происходящие в тканях головного мозга крыс, но при этом в последнем разделе рассматривает влияние среды с низкой концентрацией дейтерия на структуру и активность растительного белка – пероксидазы хрена.

3. Автор рассматривает изменение концентрации дейтерия в динамике при приеме ОДВ только в крови, почему изменение концентрации дейтерия в тканях мозга проводится только в последний день эксперимента?

Отмеченные замечания не являются критическими, не снижают ценность полученных результатов и носят рекомендательный характер.

Заключение


Таким образом, диссертационная работа «Влияние изотопного D/H обмена на ткани головного мозга крыс при действии стрессовых факторов» Козина Станислава Владимировича по своему содержанию, актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости представляет собой законченную научно-исследовательскую работу. Достоверность результатов работы не вызывает сомнений, сами результаты опубликованы и апробированы. Все основные выносимые на защиту научные положения и выводы обоснованы.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Козин Станислав Владимирович достоин присуждения искомой степени по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Настоящий отзыв на диссертацию Козина Станислава Владимирович подготовлен заведующим кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», доктором биологических наук, профессором Сыроешкиным Антоном Владимировичем, обсужден и утвержден на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», протокол № 0300-35-04/08 от «03» марта 2022 года.

Отзыв составили:

Заведующий кафедрой
фармацевтической и токсикологической химии
Медицинского института ФГАОУ ВО
«Российский университет дружбы народов»
доктор биологических наук
(05.13.01 - Системный анализ,
управление и обработка информации),
профессор

 А.В. Сыроешкин

Директор Медицинского института
ФГАОУ ВО «Российский университет
дружбы народов», доктор медицинских наук


 А.Ю. Абрамов

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.
Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82
e-mail: rector@rudn.ru; rudn@rudn.ru

Отзыв ведущей организации о значимости диссертационной работы Козина Станислава Владимировича на тему ««Влияние изотопного D/H обмена на ткани головного мозга крыс при действии стрессовых факторов»», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.