

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора физико-математических наук,  
профессора Лобышева Валентина Ивановича о диссертационной работе  
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».

Диссертационная работа Козина С.В. посвящена актуальной проблеме повышения резистентности организмов млекопитающих к действию внешних факторов, связанных с биологическими эффектами, наблюдаемыми при изменении изотопного состава употребляемой воды. Изменение внешних условий и, как следствие, параметров внутренней среды организма приводит к развитию ответной реакции организма. Сильное внешнее воздействие приводит к активной стрессовой реакции, что, в свою очередь, приводит к развитию патологического состояния и, в конечном счете, возможной гибели организма. Слабое и умеренное внешнее воздействие приводит к включению компенсаторных функций, активации организма и возникновению адаптации на данный вид стресса. Увеличение концентрации дейтерия во внутренней среде организма до 30% оказывается уже несовместимым с жизнью млекопитающих. Столь высокая концентрация может быть достигнута лишь в лабораторных условиях, поскольку природная вода содержит всего лишь 0,015% дейтерия. Наряду с этим, было установлено, что даже небольшие вариации изотопного состава воды, сопровождающие фракционирование воды в природе, приводит к значимым биологическим изотопным эффектам. Развитие методов разделения изотопов позволило получить воду с существенно уменьшенным содержанием дейтерия. Оказалось, что вода с уменьшенным содержанием дейтерия может оказывать стимулирующее влияние на некоторые функции живых организмов. При этом остается практически неизученным влияние низких концентраций дейтерия на ткани головного мозга и функциональное состояние центральной нервной системы млекопитающих. Диссертационная работа С.В. Козина направлена на изучение, возникающих на фоне снижения дейтерия во внутренней среде организма крыс, изменений резистентности организма к общей гипоксии на примере биохимических исследований тканей головного мозга крыс, поведенческого характера животных, электрофизиологических характеристик культуры нервных тканей, а также физико-химических характеристик более простых модельных систем – пероксидазы хрена и сывороточного альбумина быка. Актуальность работы не вызывает сомнений.

**Степень обоснованности и достоверности научных результатов** обеспечивается корректной постановкой экспериментов, большим количеством разнообразных методов исследования, правильной статистической обработкой полученных результатов. Положения и выводы соответствуют полученным результатам и отвечают поставленным задачам, а исследование в целом соответствует паспорту специальности биофизика в области изучения биофизики сложных систем. Текст автореферата изложен ясно и полностью отражает содержание диссертации. Основные результаты диссертации представлены в 14 печатных работах из них 6 публикаций, включены в системы цитирования Scopus, Web of Science и полностью отражают результаты диссертационной работы.

**Новизна исследования** присуща всем результатам собственных исследований диссертанта. Особо следует отметить, что на основании экспериментальных данных диссертационной работы был получен патент «Способ профилактики и коррекции метаболических и функциональных нарушений центральной нервной системы в условиях стресса». Поэтому полученные в диссертационной работе результаты вносят существенный вклад в разработку новых методов, способствующих повышению резистентности организма при действии на него повреждающих факторов, в том числе гипоксического воздействия. Было исследовано влияние низких концентраций дейтерия в воде на культуры нейронов головного мозга и каталитическую активность ферментов, а также на структурные характеристики пероксидазы и сывороточного альбумина. Полученные в результате выполнения диссертационной работы экспериментальные данные являются новыми и вносят существенный вклад в понимание механизмов, ответственных за реализацию изотопных эффектов, вызванных снижением концентрации дейтерия в организме.

#### **Оценка объема, структуры и содержания работы**

Диссертация представлена на 133 страницах машинописного текста. Структура диссертации традиционная, состоит из введения, обзора литературы, подробного изложения методов исследования, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитированной литературы из 257 источников. Иллюстративный материал включает 16 рисунков и 6 таблиц.

Обзор литературы изложен на 46 страницах. В первой части обзора литературы подробно описываются биологические эффекты воды с пониженным содержанием дейтерия на уровне организма и тканей млекопитающих. При этом автор обращает внимание на литературные источники с противоречивыми результатами. Во втором разделе

литературного обзора описываются механизмы развития стрессовой реакции в организме млекопитающих, а также подробно обсуждается функционирование стресс – лимитирующих систем организма. В последнем разделе литературного обзора рассматриваются патофизиологические процессы, возникающие в тканях головного мозга на фоне гипоксии.

Детально описана работа с объектами и методы исследования, что позволяет, при необходимости, воспроизвести любую часть исследования. В работе используются как классические биохимические и поведенческие методы, так и современные методы, используемые на культуре нервной ткани. Для определения концентрации дейтерия в сыворотке и тканях организма применяются методы ЯМР и масс-спектрометрии, а для изучения структуры белков и активности ферментов оптические спектроскопические методы. К достоинствам диссертации следует отнести изучение влияния низких концентраций дейтерия на разных уровнях организации от организменного до молекулярного, с проведением экспериментов *in vivo*, *in vitro* и на модельных системах.

В третьей главе представлены результаты работы и их обсуждение. Методом масс-спектрометрии и, разработанным в лаборатории методом ЯМР, была определена концентрация дейтерия в тканях головного мозга и в течение длительного времени изучено изменение концентрации дейтерия в сыворотке крови. Сроки воздействия низкодейтериевым питьевым режимом были выбраны исходя из полученных результатов ЯМР - исследования крови. Биохимическими методами изучено состояние антиоксидантной системы головного мозга, измерена активность основных ферментов антиоксидантной системы, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, изучено состояние глутатионовой антиоксидантной системы. Показано, что применяемая модель гипоксического воздействия способствовала развитию окислительных процессов и нарушению работы антиоксидантной системы. Изотопный D/H обмен в тканях головного мозга, вызванный потреблением воды с концентрацией дейтерия 50 ppm, на начальном этапе (в течение 2-х недель) способствует прооксидантному эффекту, отягощая действие внешнего воздействия – гипоксии. Напротив, на более поздних этапах (шесть недель) изотопный обмен D/H обмен приводит к повышению антиоксидантного статуса тканей головного мозга крыс. Наблюдается повышение резистентности организма к предъявленному гипоксическому воздействию. Исследования *in vivo* продолжаются на поведенческих тестах. В качестве таких был выбран тест в приподнятом крестообразном лабиринте, и T – образный лабиринт, отражающий когнитивные функции животных. Было показано, что изотопный D/H обмен в организме животных, вызванный длительным потреблением обеднённой дейтерием воды, не

приводил к изменению когнитивные функции животных после гипоксического воздействия. В следующем разделе представлены экспериментальные данные *in vitro*, выполненные на культуре нейронов мозжечка и результаты электрофизиологических исследований на срезах нейронов гиппокампа. Установлено, что среда с низкой концентрацией дейтерия оказывает влияние на жизнеспособность нейронов мозжечка и их функциональные показатели, такие как мембранный потенциал, уровень ионов кальция в цитоплазме и продукция активных форм кислорода. Наблюдалось снижение электрической активности нейронов гиппокампа в результате действия изотопного D/H обмена. В заключительном разделе третьей главы представлены данные о влиянии низких концентраций дейтерия среды на активность гемсодержащего фермента – пероксидазы хрена и изучено действие данной среды на структуру данного фермента и сывороточного альбумина быка. Убедительно показано, что уменьшение концентрации дейтерия в реакционной среде приводит к уменьшению скорости пероксидазного окисления, но не оказывает влияния на конформационную структуру фермента и бычьего сывороточного альбумина. Представленный в работе графический и табличный материал в достаточной степени отражает полученные в ходе экспериментов данные.

В разделе заключение резюмированы все экспериментальные данные диссертационной работы, представлено обсуждение полученных результатов и приведена гипотетическая схема предполагаемого механизма развития защитного эффекта к гипоксии на фоне изотопного D/H обмена. Сформулированные выводы полностью отражают экспериментальные результаты и теоретические положения диссертационной работы.

Серьезных замечаний к работе не возникло, тем не менее имеется ряд замечаний к изложению материала. На стр.7 в пункте б пропущено слово дейтерия. На стр. 32, 33, 34 некорректно написаны схемы реакций, хотя далее на стр. 38 последние из них написаны верно. На стр.47 для воды используется термин отчищенная, но лучше бы было очищенная. На стр. 48 используется интервал времени неделя, содержащий 6 дней, а не 7, как обычно. На стр.108 в выводе 4б пропущено слово *концентрации* (ионов кальция). В тексте используется большое количество сокращений, что при отсутствии расшифровки в начале раздела затрудняет чтение работы, тем более удивительно, что расшифровка иногда появляется ближе к концу раздела.

Высказанные замечания имеют чисто технический характер и не затрагивают суть работы, тем самым не уменьшают значимость полученных результатов и выводов, которые являются логическим завершением работы.

В целом, диссертация Козина Станислава Владимировича «Влияние изотопного D/H обмена на ткани головного мозга крыс при действии стрессовых факторов», представленная

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика, является научно – квалификационной работой, которую можно характеризовать как научное достижение в области изучения биологических изотопных эффектов, сопровождающих замену обычной воды на воду с уменьшенной концентрацией дейтерия. Представленная к защите диссертация, соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям критериям, установленным п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2003 года № 842, а ее автор Козин Станислав Владимирович, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Официальный оппонент:

доктор физико – математических наук,  
профессор кафедры биофизики физического факультета  
Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова

В.И. Лобышев

Адрес: 119992, г. Москва  
Ленинские горы, Дом 1, строение 2  
Телефон: +7 (495) 939-1687  
e-mail: [lobyshev@yandex.ru](mailto:lobyshev@yandex.ru)  
Сайт организации: [phys.msu.ru](http://phys.msu.ru)

Собственноручную подпись Лобышева В.И. заверяю.

Декан Физического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова  
профессор



Н.Н. Сысоев