«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научной работе и
инновациям ФГАОУ ВО
«Национальный исследовательский
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»
докт. ф.-м. наук В.Б. Казанцев

«30» ноября 2015

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Сюсина Ильи Владимировича «Влияние ионов Ca^{2+} на фосфолипидный состав, состояние и морфологические характеристики эритроцитов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Актуальность темы. Работа посвящена экспериментальному исследованию влияния ионов Ca^{2+} на фосфолипидный состав эритроцитарных мембран, изменение морфологических характеристик, гемоглобина и ядра эритроцитов голубя при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} в инкубационной среде и выявления защитного механизма от действия повышенных концентраций ионов Ca^{2+} соединений фенольной природы. Роль кальция, как регулятора физиологических процессов, протекающих в клетке, хорошо известна. Нарушение внутриклеточного гомеостаза этого иона, сопровождающееся существенным повышением его концентрации в цитоплазме клетки, лежит, как полагают, в основе механизма клеточной гибели при целом ряде патологических состояний таких как ишемия, аутоиммунные процессы и т.д. Поэтому работы, имеющие в своем основании разработку и последующее испытание нового подхода к оценке механизмов действия ионов Ca^{2+}, с использованием усовершенствованного методологического и методического аппарата, представляют значительный интерес. Пути решения этой проблемы в работе связаны с использованием в качестве модельной системы эритроцитов голубя, особенностью которых является наличие ядра, что позволяет раскрыть общие закономерности функционирования других клеток организма, и использование современных методов исследования, включающих метод лазерной интерференционной микроскопии, спектроскопию комбинационного рассеяния, метод «ДНК-комет» и др.

Цель исследования обозначена четко и ясно – изучение роли Ca^{2+} в регуляции морфологических и функциональных характеристик эритроцитов, и лежащих в их основе изменений в составе фосфолипидов, фосфоинозитидов и их метаболитов, а также в процессе разрушения клеточного ядра. В соответствии с целью и поставленными для ее достижения задачами по исследованию влияния повышенной концентрации ионов Ca^{2+} на фосфолипидный, фосфоинозитидный состав мембран эритроцитов, на морфологические характеристики эритроцитов, свойства гемоглобина и ядра автором выявлено, что ионы Ca^{2+} влияют не только на состав мембраны эритроцита, они также способны вызывать морфологические изменения всей клетки, приводят к перераспределению гемоглобина и разрушению ядра в эритроцитах, при этом «вид комет», полученных в ходе экспериментов свидетельствует о том, что клеточная гибель происходит по апоптозному пути. Добавление флавоноидов в пробы, инкубируемые в присутствии повышенной концентрации ионов Ca^{2+}, приводит к замедлению процессов, вызванных ионами Ca^{2+}.

Научная новизна исследований заключается в проведении комплексного анализа изменения состава и состояния мембран, морфологических характеристик клетки, гемоглобина, ядра эритроцитов голубя при действии высоких концентраций ионов Ca^{2+} в инкубационной среде и обоснования возможности использования флавоноидав в ингибировании действия высоких концентраций ионов кальция.

Теоретическая и практическая значимость работы связана с выявлением механизмов действии высоких концентраций ионов Ca^{2+}, которые могут быть использованы в практической медицине для интерпретации патологических процессов при солевом стрессе, а также обоснования использовании веществ натуральных соединений фенольной природы для сохранения функциональной активности гемоглобина эритроцитов.

По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ из них 2 статьи, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Результаты работы представлены на конференциях регионального и международного масштаба.

Общая характеристика работы. Диссертационная работа И.В. Сюсина написана в классическом плане и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы (186 источников, из которых

127 принадлежат иностранным специалистам). Работа хорошо иллюстрирована – она содержит 24 рисунка и 1 таблицу.

Во **введении** обоснованы актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, а также показана теоретическая и практическая значимость результатов.

Обзор литературы содержит современные представления о строении мембран эритроцитов, ионном составе эритроцитов и механизмах регуляции ионного состава, участие ионов Ca^{2+} в функционировании клетки. Разобраны нарушения, происходящие при увеличении концентрации кальция, а также механизмы защиты клеток при действии повышенной концентрации ионов Ca^{2+}. Более половины цитируемых источников относятся к новому тысячелетию, следовательно, актуальность проводимых исследований не вызывает сомнений. В качестве замечания можно отметить, что в представленном обзоре приводятся теоретические представления об структурной организации эритроцитов млекопитающих и нет анализа особенностей эритроцитов птиц. Кроме того, обзор литературы занимает фактически половину диссертационной работы и перегружен неправильно оформленными ссылками на литературу, которые включают не только авторов и год исследования, а полную библиографическую ссылку работы, что дублирует список литературы.

В главе «**Объект и методы исследования**» обращает на себя внимание значительный спектр используемых методов: методы экстрагирования фосфолипидов из мембран эритроцитов голубя, тонкослойная хроматография фосфолипидов, их идентификация, количественное определение, методы исследования морфометрических характеристик эритроцитов голубя с помощью лазерноого интерференционного микроскопа и спектроскопии комбинационного рассеяния, изучение повреждений ДНК эритроцитов голубя при помощи метода «ДНК-комет», определение внутриклеточной концентрации кальция с помощью красителя Fura Red. Для статистической обработки результатов используется традиционные критерии и стандартный набор используемых программ. В качестве замечаний следует отметить отсутствие концентрации флавоноидов, используемой в работе.

Основное содержание собственных исследований изложено в главе «**Результаты и обсуждения**», посвященной изучению действия повышенных концентраций ионов Ca^{2+} на фосфолипидный спектр мембран эритроцитов, морфологию эритроцитов, состояние гемоглобина и ядра, которую соискатель логично подразделяет на смысловые части. В них прослеживается четкая последовательность от анализа модификации фосфолипидной составляющей эритроцитарных мембран при увеличении

концентрации ионов Ca^{2+} в инкубационной среде, вызывающей изменения морфологических характеристик красных клеток крови, до вариантов опытов с флавоноидами, определяющих торможение морфологических изменений эритроцитов, связанных с повышением ионов Ca^{2+}. Далее проводится исследование свойств и распределения гемоглобина в эритроцитах голубя и выявляются процессы, связанные с фрагментацией и полным разрушением ядер, а также увеличением количества повреждений в ДНК при действии высокой концентрации ионов Ca^{2+}. Данная последовательность событий позволила автору выявить закономерности изменений, происходящих в эритроцитах голубя при действии повышенных концентраций ионов Ca^{2+} в среде, что нашло отражение результатов работы в виде обобщения, сделанного в разделе «Заключение» и формулировке выводов.

Выводы диссертации обоснованы представленным экспериментальным материалам и соответствуют поставленным задачам.

К недостаткам этого раздела диссертации можно отнести то, что измерение внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} автором проведилось в течении 30 мин. инкубации (рис. 3.1, стр. 66 диссертации и рис. 3.1, стр. 8 автореферата), а фракционный анализ фосфолипидов – в течение 40 мин (рис. 3.2, стр. 9 автореферат). Во всех рисунках не достаточно понятно относительно чего считалась статистическая значимость результатов, можно предположить, что относительно контрольной пробы, но тогда не понятно, почему на рис. 3.3. – 3.7, стр. 70 – 75 диссертации и рис. 3.2, стр. 9 автореферата не проставлена статистическая значимость результатов либо на 30 мин, либо на 20 мин. инкубации. Аналогичные недочеты наблюдаются на всем протяжении работы. При этом в автореферате большинство рисунков вообще не содержит пояснение статистической значимости. Остается непонятным, почему без инкубации исходный уровень исследуемых показателей в контрольной и опытной пробах сильно отличается, хотя в материалах и методах исследования написано «отмытую эрмассу разливали в две пробирки, одну оставляли без изменений, другую инкубировали с хлоридом кальция». Кроме того, в ходе работы возникает вопрос, который вытекает непосредственно из полученных автором результатов. Так, в проведенном исследовании отмечено, что в контроле инкубация эритроцитов в среде не содержащей ионов Ca^{2+} приводит к уменьшению внутриклеточной концентрации данного иона (и весьма существенно, в среднем на 50%) при этом во всех дальнейших исследованиях в контроле изменений изучаемых параметров (фосфолипидного спектра, морфологии эритроцитов, апоптотического индекс и др.) не выявлено, хотя данные литературы свидетельствуют, что отсутствие Ca^{2+} в инкубационной среде

сопровождается, например, усилением выхода гемоглобина из клеток в среду инкубации (в работе Исаевой А.В. и др., 2011). Как вы считаете, какое влияние оказывает дефицит ионов кальция на эритроциты?

Однако, сделанные замечания не умаляют научно-практической ценности диссертации и не изменяют общего положительного впечатления от работы. Автореферат диссертации четко и полностью отражает ее содержание.

В целом, И.В. Сюсиным выполнена трудоемкая работа, произведен достаточный объем исследований при большом числе наблюдений и детальном анализе полученных результатов, что позволило решить поставленные задачи и достигнуть цели исследования.

Заключение. Представленная работа Сюсина И.В. «Влияние ионов Ca^{2+} на фосфолипидный состав, состояние и морфологические характеристики эритроцитов» является законченным научным исследованием, в котором решена актуальная научная задача, имеет научное и практическое значение. В работе разобраны механизмы, происходящие в эритроцитах голубя, при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} и дано обоснование применения флавоноидов в защите эритроцитов при кальциевой нагрузке. По актуальности темы, методологии, объему и анализу самостоятельно проведенных исследований работа Сюсина Ильи Владимировича «Влияние ионов Ca^{2+} на фосфолипидный состав, состояние и морфологические характеристики эритроцитов», соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор достоин присуждения искомой степени по специальностям 03.01.02 – биофизика.

Работа обсуждена на заседании кафедры биохимии и физиологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (протокола № 4 от 27 ноября 2015 года).

Зав. кафедрой биохимии и физиологии ИББМ,
доктор биологических наук, профессор А.П. Веселов

Отзыв подготовила:
Доцент кафедры биохимии и физиологии ИББМ,
доктор биологических наук А.В. Дерюгина
e-mail: derugina69@yandex.ru, (831)4623211,
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, ГСП-20, 23

Подпись Веселова А.П., Дерюгиной А.В. заверяю. Ук. секр. [illegible]