

## ОТЗЫВ

официального оппонента Внукова Валерия Валентиновича  
на диссертационную работу Крыльского Евгения Дмитриевича  
«СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ  
РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ТИОКТОВОЙ  
КИСЛОТЫ», представленную на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

### Актуальность исследования

Актуальность темы представленной диссертационной работы не вызывает сомнений, поскольку ревматоидный артрит является достаточно распространенным аутоиммунным заболеванием, сопровождающимся существенным снижением качества жизни пациентов. В настоящее время имеются данные, свидетельствующие об участии активных форм кислорода в патогенезе ревматоидного артрита. Исходя из этого, значительный интерес вызывают исследования особенностей свободнорадикального окисления и функционирования антиоксидантной защиты организма при данном заболевании. Вместе с тем, представленные сведения литературы, посвященные вышеуказанным проблемам, являются в некоторой степени противоречивыми, оставляя открытыми ряд вопросов. Помимо этого, высокую актуальность имеют исследования, направленные на поиск потенциальных веществ – протекторов, обладающих антиоксидантными свойствами. В качестве такого соединения может выступать тиоктовая кислота – биологически активное вещество, участвующее в ряде биологических процессов. Таким образом, в связи с тяжестью протекания и широкой распространенностью ревматоидного артрита актуальной задачей представляется анализ возможности применения препаратов на основе тиоктовой кислоты в разработке новых лекарственных средств, применяемых при терапии данного заболевания. Исходя из этого, было проведено

исследование параметров свободнорадикального окисления, активности антиоксидантной системы и уровня транскриптов генов важнейших антиоксидантных ферментов при развитии ревматоидного артрита и воздействии тиоктовой кислоты в эксперименте на животных. Теоретическая значимость работы заключается в выяснении механизмов регуляции свободнорадикального гомеостаза в развитии патологического процесса и поиске способов его коррекции, что позволит найти оптимальные пути решения ряда фундаментальных и прикладных биологических и медицинских проблем.

Таким образом, актуальность темы диссертации Крыльского Е.Д. не вызывает сомнения.

Постановка цели диссертационного исследования отвечает современным представлениям о патогенезе ревматоидного артрита как о системной патологии и является своевременной и патогенетически обоснованной.

#### **Научная новизна исследования**

Автором впервые проведено комплексное исследование интенсивности протекания свободнорадикального окисления, апоптотических процессов, активности ферментативного звена и содержания неферментативных компонентов антиоксидантной системы, уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов, активности некоторых ферментов окислительного метаболизма, при развитии ревматоидного артрита и воздействии тиоктовой кислоты в эксперименте на животных. Показано, что введение протектора приводило к снижению интенсивности свободнорадикального окисления и апоптотических процессов, а также нормализации функционирования антиоксидантных ферментов, выражавшейся в изменении показателей их активности и уровня транскриптов генов в направлении контрольных значений. Исследовано воздействие тиоктовой кислоты на работу некоторых НАДФН-

генерирующих ферментов, поставляющих восстановительные потенциалы для глутатионзависимой антиоксидантной системы.

Научная обоснованность результатов диссертационного исследования аргументирована большим количеством фактического материала в динамике эксперимента – с момента моделирования ревматоидного артрита.

Таким образом, новизна не только данных, полученных в результате проведенных исследований, но и новизна ряда подходов автора не вызывает сомнения.

#### **Научно-практическая значимость работы**

Практическая значимость диссертационной работы заключается в возможности использования результатов проведенного исследования в качестве основы для разработки новых способов метаболической коррекции состояния окислительного стресса, развивающегося при ревматоидном артрите. Кроме этого, полученные в ходе работы данные способствуют углублению фундаментальных представлений о путях реализации протекторного и антиоксидантного действия тиоктовой кислоты, а также пониманию механизмов, лежащих в основе нарушений метаболизма при развитии данного заболевания. Материалы исследования применяются в учебной работе на медико-биологическом факультете Воронежского государственного университета, а также при проведении практикумов, выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ студентами Воронежского государственного университета.

#### **Структура диссертации**

Структура диссертации стандартна для работ подобного рода. В диссертации, изложенной на 216 страницах текста, представлены: введение, литературный обзор, глава, содержащая описание объекта и методов исследования, 3 главы, содержащие полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы (420 источников).

---

Иллюстративный материал включает 1 схему, 9 таблиц и 37 рисунков, а также 10 рисунков в Приложении.

В диссертационной работе представлен достаточно обстоятельный литературный обзор, в котором обобщаются данные по характеристике ревматоидного артрита, роли свободнорадикального окисления в патогенезе заболевания и функционированию антиоксидантной системы организма в условиях оксидативного стресса. Подробно освещены вопросы, касающиеся механизмов развития ревматоидного артрита и участия в данном процессе ряда компонентов иммунной системы, имеющих значение для диагностики заболевания. Обзор литературы охватывает широкий круг вопросов, а его отдельные части взаимосвязаны и дополняют друг друга, имеют непосредственное отношение к основной теме диссертации.

В целом обзор литературы написан с использованием большого количества современных источников, которые достаточно аккуратно цитируются, изложен хорошим языком и с интересом читается.

Экспериментальная часть работы выполнена на высоком научно-методическом уровне. В работе чётко описана постановка экспериментов на животных, правильно спланированы контрольные серии. Описание постановки эксперимента не вызывает сомнения в его корректности. В исследованиях используются адекватные поставленным задачам современные биохимические методы, которые подробно описаны и могут быть легко воспроизведены. Исследование интенсивности свободнорадикальных процессов проводилось методами биохемилюминесценции и спектрофотометрии. Маркерные показатели развития патологии определяли спектрофотометрическими, турбидиметрическими, иммунологическими, биометрическими методами. Интенсивность апоптотических процессов оценивали по степени фрагментации ДНК методом электрофореза и спектрофотометрически по активности каспазы-3 и -8. Активность антиоксидантной защиты организма анализировалась с помощью спектрофотометрических методов и ПЩР в

реальном времени. Результаты экспериментальной работы подвергались математической обработке с использованием статистических критериев.

Следовательно, материалы, использованные в диссертации, по объему и методическому уровню достаточны для анализа и последующего обсуждения.

В главе 3 приведены результаты оценки ряда маркерных показателей ревматоидного артрита и параметров свободнорадикального гомеостаза в динамике развития патологии. Согласно полученным диссертантом данным, максимальная степень изменения анализируемых показателей достигалась на 15 день после индукции ревматоидного артрита, что согласуется с проанализированными литературными источниками о наиболее выраженных патологических изменениях при индуцировании ревматоидного артрита с помощью адьюванта Фрейнда к этому сроку.

В главе 4 приводятся результаты исследования воздействия тиоктовой кислоты на интенсивность свободнорадикального окисления и апоптотических процессов в тканях крыс с ревматоидным артритом. Было показано, что анализируемые параметры под действием тестируемого соединения изменялись в сторону контрольных значений.

В главе 5 представлены данные по воздействию тиоктовой кислоты на активность антиоксидантной системы, а также уровень транскриптов генов важнейших антиоксидантных ферментов. Исходя из полученных диссертантом результатов, введение протектора приводило к сдвигу анализируемых параметров в направлении нормы.

Материалы, представленные в этих главах, достаточно объемны.

Таким образом, в главах, где представлены результаты собственных исследований, автору удалось представить достаточно последовательно и логично полученный экспериментальный материал в легко воспринимаемой форме. Все научные положения, сформулированные в диссертации на основании полученного экспериментального материала, являются достоверными и вполне обоснованными. Они базируются на большом

объёме статистически обработанного фактического материала, полученного лично диссертантом.

В заключении диссертант приводит гипотетическую схему, отражающую возможное участие тиоктовой кислоты в регуляции свободнорадикального гомеостаза при ревматоидном артрите.

Полученные в данной работе результаты могут быть интересны с точки зрения обобщения и систематизации представлений о сопряжении функционирования отдельных компонентов антиоксидантной системы и ферментов клеточного метаболизма, имеющих значение для регуляции уровня активных форм кислорода при патологиях, сопровождающихся окислительным стрессом, и действии веществ-протекторов с антиоксидантными свойствами.

Обсуждение результатов в диссертации полностью соответствует полученным экспериментальным данным, которые подтверждены конкретным фактическим материалом проведенных исследований с привлечением позиций современной литературы..

Таким образом, на основании проведенного анализа рецензируемой работы можно заключить, что в исследовании содержится фактический материал, позволяющий автору сформулировать основные положения, выносимые на защиту. Выводы рецензируемой диссертации, вытекающие из содержания работы, являются обоснованными и соответствуют полученным данным.

По теме диссертации опубликовано большое количество работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. Результаты работы представлены на многочисленных конференциях регионального и международного масштаба. Опубликованные работы и автореферат отражают основные положения и результаты диссертационного исследования.

Принципиальных замечаний к работе Крыльского Е.Д. нет. Однако в работе встречаются некоторые технические недостатки, неудачно сформулированные фразы, некорректно использованные обороты ( стр. 9,47, 50,63,69,73,82, и т.д. )

Кроме того, изучение, на мой взгляд, интересной экспериментальной работы, выполненной диссертантом, вынуждает рецензента поставить перед автором ряд вопросов, которые, несомненно, носят дискуссионный характер и подчёркивают актуальность и значимость выполненной диссертации:

1. Первый, и главный вопрос, связан с использованием в качестве протектора при ревматоидном артрите тиоктовой кислоты:

А) Каким образом определялись оптимальные концентрационные и временные параметры введения тиоктовой кислоты?

Б) Каковы основные пути поступления, распределения и метаболизма тиоктовой кислоты в организме?

В) В диссертационной работе ( п.п. 1.3.2.2., стр. 68-70 ) указывается на ряд возможных механизмов проявления тиоктовой кислотой антиоксидантных свойств. Каковы основные (или основной) механизмы протекторного действия тиоктовой кислоты при ревматоидном артрите?

Г) Имеются ли литературные данные по использованию тиоктовой кислоты в качестве протектора при других патологиях?

Д) Существуют ли лекарственные средства на основе тиоктовой кислоты, разрешенные к применению Фармкомитетом? Если да, то при каких заболеваниях рекомендовано их использование?

2. Почему интенсивность свободнорадикального окисления Вы оценивали по содержанию ДК – первичных продуктов ПОЛ, а не по промежуточным или конечным, или не определяли всю линейку продуктов ПОЛ?

3. В диссертационной работе Вы рассматриваете цитрат как низкомолекулярный антиоксидант. По тексту работы не совсем понятно, что является основанием для этого и каков, в таком случае, антиоксидантный механизм его действия?

4. Целесообразным было бы освещение вопроса о возможных механизмах реализации апоптоза в условиях развития ревматоидного артрита, индуцированного введением полного адьюванта Фрейнда.

Исходя из вышеизложенного, работа Крыльского Е.Д. представляется новой, интересной, проведенной на высоком методическом уровне. Выводы, сделанные автором, подкреплены обширным экспериментальным материалом.

Диссертационная работа Крыльского Е.Д. соответствует 2 пунктам паспорта специальности 03.01.04 – биохимия: п.10 – связь биохимических процессов с причинами болезней и изысканием путей их эффективного лечения; п.14 – изучение роли активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления и свободнорадикальных продуктов в нарушениях и регулировании метаболических процессов в биосистемах.

### **Заключение**

Диссертация Крыльского Евгения Дмитриевича «Свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты» представляет собой завершённое научное исследование, вносящее существенный вклад в решение проблемы изучения основ развития ревматоидного артрита и путей коррекции патологического состояния, полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением



Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а её автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Отзыв подготовил :  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Южный федеральный университет»,  
Академия биологии и биотехнологии  
им. Д.И. Ивановского

Внуков Валерий Валентинович  
Доктор биологических наук, профессор  
Заведующий кафедрой  
биохимии и микробиологии  
344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1  
тел: +7-904-445-29-27  
e-mail: [vvvnukov@sfedu.ru](mailto:vvvnukov@sfedu.ru)

10 октября 2016



Личную подпись Внукова В.В.



секретарь Совета  
Южного федерального университета  
Мирошниченко О.С.