



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИЭФБ РАН
доктор биол. наук М.Л. Фирсов

"14" июня 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Антоновой Екатерины Петровны** «**Антиоксидантные ферменты у природно-адаптированных к гипоксии–реоксигенации млекопитающих**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

Актуальность темы выполненной работы. Роль активных форм кислорода (АФК) в состоянии гипоксии и реоксигенации очень слабо изучена, несмотря на имеющийся теоретический и практический материал, широко представленный в научной литературе. Исследование особенностей систем производства АФК и антиоксидантной защиты у природно-адаптированных к гипоксии–реоксигенации млекопитающих представляется актуальным, т.к. может внести существенный вклад в решение целого ряда теоретических и практических проблем, связанных как с эволюционной физиологией, так и с практической медициной. Животные, периодически подвергающиеся гипоксии-реоксигенации, владеют определённым набором биохимических и физиологических адаптаций. Одним из способов поддержания на стационарном уровне АФК и предотвращения окислительных повреждений является изменение активности антиоксидантных ферментов (АОФ) – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Исследования роли этих ферментов, как и вообще роли АФК, выполнены в основном на крупных морских млекопитающих и сусликах, в то время как сведения об адаптациях

полуводных ныряльщиков, мелких зимоспящих и подземно-роющих животных, также испытывающих гипоксию-реоксигенацию, весьма малочисленны.

Научная новизна исследования. В результате проведенного исследования установлено, что по сравнению с незимоспящими видами млекопитающих у летучих мышей в начале гибернационного периода активность каталазы в сердце и СОД в скелетной мышце выше, при этом к середине спячки активность каталазы снижалась, а активность СОД повышалась. Также установлено, что полуводные грызуны имеют повышенный уровень активности СОД и каталазы в печени, почках и сердце по сравнению с неадаптированными к нырянию животными. Максимальное количество различий в активности АОФ между ныряющими и наземными грызунами выявлено в наиболее чувствительных к смене кислородных условий тканях сердца. Становление дефинитивного профиля АОФ в онтогенезе у полуводных грызунов происходит раньше, чем у сухопутных.

Значимость для науки и практической деятельности. Полученные соискателем данные об участии АОФ в адаптациях гибернирующих, полуводных и подземно-роющих млекопитающих расширяют и углубляют существующие представления о механизмах и стратегиях адаптаций к условиям гипоксии-реоксигенации, способствуют пониманию механизмов естественного предотвращения их патологических последствий. Адаптация организма к экстремальным условиям среды представляет большой интерес для экспериментальной и практической медицины.

Структура и содержание работы. Диссертация изложена на 113 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 разделов результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 246 наименований, из них 201 иностранных. Диссертация включает 3 таблицы и 12 рисунков, изложена достаточно хорошим профессиональным и

литературным языком. Автореферат и публикации достаточно полно отражают содержание диссертационной работы.

Первая глава работы посвящена обзору литературы по проблеме исследования. Проанализированы данные об особенностях антиоксидантной системы у ныряющих млекопитающих, роль антиоксидантной системы в адаптациях подземно-роющих млекопитающих, эколого-физиологические особенности мелких млекопитающих. На основе анализа сделаны выводы о том, что различные физиологические системы, в том числе система антиоксидантной защиты, повышают устойчивость животных к недостатку кислорода во время спячки и реоксигенации при пробуждении, внося определенный вклад в высокие адаптивные возможности гибернирующих млекопитающих. В то же время, обозначены нерешенные проблемы, требующие более детального изучения, что позволило диссертанту определить группу млекопитающих, которая разнообразна филогенетически, по биологическим типам, по размерам и уровню метаболизма.

Объектами исследования были рукокрылые (северный кожанок, ночница Брандта, бурый ушан, водяная ночница), грызуны (крыса лабораторная, водяная полевка, ондатра, европейский бобр) и насекомоядные (обыкновенная бурозубка, водяная кутора, обыкновенный крот). Лабораторных крыс содержали в стандартных условиях вивария, изъятие или отлов животных проводили в Республике Карелия после получения соответствующих разрешений и содержали в специальных лабораторных условиях в течение суток, после чего производили декапитацию и отбор образцов с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС), «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Биоэтических правил проведения исследований на человеке и животных». В органах животных определяли активность супероксиддисмутазы, каталазы, количества белка по Лоури.

В главе 3 представлены результаты исследования: активность антиоксидантных ферментов у гибернирующих летучих мышей, активность антиоксидантных ферментов у млекопитающих (Rodentia, Insectivora) различного экогенеза, возрастные изменения активности антиоксидантных ферментов у полуводных и сухопутных насекомоядных и грызунов. По результатам исследования установлено участие АОФ в адаптивных реакциях к гипоксии-реоксигенации у гибернирующих, ныряющих и подземно-роющих млекопитающих. Установлено, что по сравнению с сопоставимыми по массе незимоспящими видами млекопитающих летучие мыши характеризуются повышенной активностью СОД в скелетной мышце; снижение активности каталазы и увеличение активности СОД в ходе гибернации в тканях летучих мышей является одним из физиологических механизмов приспособления к периодической гипоксии-реоксигенации. Показано, что у полуводных грызунов активность АОФ в органах (печень, почки, сердце) выше, чем у наземной крысы. Обнаруженная у полуводных грызунов видоспецифичность связанных с нырянием изменений АОФ (повышенная активность СОД в тканях органов ондатры и каталазы у бобра) является отражением экологической специализации этих видов. Среди исследованных видов насекомоядных наиболее высокий уровень активности СОД (легкие и скелетная мышца) и каталазы (печени, почки, сердце и легкие) отмечался у подземно-роющего крота, что связано с обитанием в среде с дефицитом кислорода и повышенным содержанием углекислого газа. Установлено, что возрастные изменения исследованных показателей у полуводных грызунов были выражены в меньшей степени, чем у насекомоядных. Автор работы полагает, что дефинитивный уровень активности АОФ у ныряльщиков формируется на более ранних стадиях онтогенеза. Из всех исследованных органов антиоксидантная защита сердца оказалась наиболее чувствительной к действию онтогенетического (насекомоядные, грызуны) и сезонного (рукокрылые) факторов.

Достоверность полученных Антоновой Е.П. научных результатов обеспечена детальным теоретическим анализом проблемы, четким определением темы исследования, цели и задач, применением эколого-биологических, физиологических и биохимических методов, корректного математического анализа. Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики. Сравнение проводили используя непараметрический критерий (U) Вилкоксона-Манна-Уитни и кластерный анализ (метод ближайшего соседа). Для оценки степени влияния факторов использовали дисперсионный анализ.

Материалы диссертации отражены в 25 работах автора, включающих 8 статей, из которых 5 в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы исследования вошли в зарегистрированную базу данных «Состояние антиоксидантной системы млекопитающих различного экогенеза при влиянии факторов среды».

При ознакомлении с диссертацией возникли следующие **замечания и вопросы:**

1. Диссертант повсеместно применяет бытовой термин "перекись водорода" вместо профессионального "пероксид водорода". Кроме того, следует отметить некорректное отождествление или переподчинение в ряде случаев смысла терминов "активные формы кислорода" и "свободные радикалы"; автору следовало в обзоре привести определения этих понятий или даже краткую эволюцию их смысла, имевшую место за последние годы, чтобы в дальнейшем придерживаться более строгой логики в их употреблении. Наконец, обращает на себя внимание употребление словосочетания "окислительный стресс", которое является русскоязычным анахронизмом, дающим искаженное представление о сути явления. По крайней мере, надо употреблять более профессиональный англоязычный термин "оксидативный стресс", смысл которого не сводится к процессам окисления.

2. В разделе 2 "Материалы и методы" отмечено, что образцы тканей печени, почек, сердца, легких и скелетных мышц исследованных животных замораживали и хранили до проведения анализа при -25°C . Поскольку длительное хранение биологического материала при такой температуре приводит к потере активности исследуемых ферментов, какие сроки хранения имели место? Проводился ли анализ зависимости активности ферментов от температуры и длительности хранения? Имеются ли сведения о влиянии условий хранения на величину погрешности исследуемых величин?

3. В разделе 3.2 повышенную активность СОД автор связывает с усиленным образованием супероксида в тканях ныряльщиков, поскольку (цитирую) "известно, что активность фермента изменяется в ответ на изменение концентрации своего субстрата" (ссылка не приведена, хотя понятно, что эта зависимость вытекает из общекинетических закономерностей, наблюдаемых *in vitro*, и, как правило, не применимых для интерпретации динамики активности ферментов *in vivo*). В то же время, на стр.66 со ссылкой на работу (Martin et al., 2002) изменение активности СОД и других АОФ связывают с изменением экспрессии генов этих ферментов, а на стр.83 сказано, со ссылкой на 2 работы зарубежных авторов, что "основным механизмом быстрой регуляции активности СОД является фосфорилирование и дефосфорилирование молекулы фермента (MacDonald, Storey, 1999; Storey, 2015)". Задавать автору вопрос в отсутствие собственных данных об экспрессии генов или посттрансляционных модификациях смысла не имеет, поэтому ограничимся замечанием о недостаточно внимательном анализе литературных данных и – в некоторых случаях - чрезмерно упрощенном толковании результатов собственных исследований.

Указанные замечания и недостатки не снижают общую положительную оценку диссертации, а вопросы могут послужить предметом для дискуссии или дальнейших исследований.

Заключение. По актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных

данных представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, и может быть представлена к публичной защите в диссертационный совет Д004.017.02 по специальности 03.03.01 – физиология.

Отзыв на диссертацию и автореферат составлен заведующим лабораторией сравнительной биохимии ферментов, доктором биологических наук Н.В. Гончаровым. Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на заседании лаборатории сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), протокол №3 от 06.06.2016.

Заведующий лабораторией сравнительной биохимии ферментов,
доктор биологических наук  Н.В. Гончаров
ИЭФБ РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза 44.
(812) 905-89-10 ngoncharov@gmail.com

Подпись д.б.н. Гончарова Н.В. заверяю 
Ученый секретарь ИЭФБ РАН Е.Н. Ребане

СВЕДЕНИЯ СВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное название: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Сокращенное название: ИЭФБ РАН.

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, просп. Тореза, д.44.

Телефон: (812) 552-7901, факс: (812) 552-3012

e-mail: office@iephb.ru <http://http.www.iephb.ru/>

СВЕДЕНИЯ
о ведущей организации по диссертации

Антоновой Екатерины Петровны

На тему: «Антиоксидантные ферменты у природно-адаптированных к гипоксии–реоксигенации млекопитающих».

На соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.03.01 – физиология.

Полное наименование и сокращенное наименование организации	Место нахождения: почтовый адрес, телефон,	адрес электронной почты	адрес официального сайта в сети интернет	Список публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в журналах списка ВАК за последние 5 лет (не более 15 публикаций)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН).	194223, г. Санкт-Петербург, просп. Тореза, д.44. Тел.: (812) 552-7901, факс: (812) 552-3012	office@iephb.ru	http://http.www.iephb.ru/	1) Кудрявцев И.В., Гарнюк В.В., Надеев А.Д., Гончаров Н.В. Пероксид водорода модулирует экспрессию поверхностных антигенов эндотелиальными клетками пупочной вены человека при воздействии in vitro // Биологические мембраны.- 2013.- Т.30, № 5-6.- С.438-444. 2) Новожилов А.В., Тавровская Т.В., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В., Маслова М.Н., Морозов В.И. Влияние антиоксидантов на состояние эритроцитов крыс в условиях истощающей беговой нагрузки // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т.99, № 10. – С. 1223-1232. 3) Надеев А.Д., Зинченко В.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Токсические и сигнальные эффекты активных форм кислорода. Токсикологический Вестник. 2014, №2, с.22-27. 4) Новожилов А.В., Т.В.Тавровская, Н.Г.Войтенко, М.Н.Маслова, Н.В.Гончаров, В.И.Морозов. Эффективность экстракта зеленого чая в эксперименте с использованием двух моделей физической нагрузки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. - Т.158. - №9. - с.327-332. 5) Goncharov NV, Avdonin PV, Nadeev AD, Zharkikh IL, Jenkins RO. Reactive Oxygen Species in Pathogenesis of Atherosclerosis. Curr Pharm Des. 2015; 21(9):1134-46.

				6) Надеев А.Д., И.В. Кудрявцев, М.К. Серебрякова, П.В. Авдонин, В.П. Зинченко, Н.В. Гончаров. Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода // Цитология. 2015, 57(12): с.909-916. 7) Минигалин А.Д., Войтенко Н.Г., Воробьев А.А., Корф Е.А., Новожилов А.В., Петухова О.В., Баранова Т.И., Гончаров Н.В. Исследование взаимосвязей физиологических и биохимических показателей человека в динамике после выполнения предельной физической нагрузки // Лечебная физкультура и спортивная медицина. 2015, №6(132) с.14-18. 8) Smetanin IA, Novikov MS, Agafonova AV, Rostovskii NV, Khlebnikov AF, Kudryavtsev IV, Terpilowski MA, Serebriakova MK, Trulioff AS, Goncharov NV. A novel strategy for the synthesis of thermally stable and apoptosis-inducing 2,3-dihydroazetes. Org Biomol Chem. 2016 (14) 4479-87. 9) Жарких И.Л., Надеев А.Д., Цитрин Е.Б., Гончаров Н.В., Авдонин П.В. Подавление блокаторм двупоровых каналов trans-NED19 и пероксидом водорода индуцированных гистамином расслабления аорты крысы и кальциевого сигнала в эндотелиальных клетках // Известия РАН Серия биологическая 2016, №3,1-9.
--	--	--	--	---

Дата

14.06.2016

Ученый
секретарь

Подпись



(Ребане Е.Н.)