

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Львовской Елены Ивановны на диссертационную работу Щербакова Дениса Леонидовича на тему: «Влияние нейромедиаторов на перекисное окисление липидов и антиокислительную активность при иммобилизационном стресс-воздействии у крыс разного возраста», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

**Актуальность исследования.** Диссертационная работа посвящена решению актуальной проблемы современной физиологии - исследованию физиологических изменений нервной системы при иммобилизационном стрессе, ассоциированных с изменениями в системе «перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита». Иммобилизационный стресс часто встречается в живой природе, ветеринарии и клинической медицине (состояния после травм, операций, врожденной и приобретенной нейрогенной патологии). Обездвиженный организм испытывает при этом дополнительное повреждающее воздействие, нуждается в специальных методах коррекции. Особенно эта ситуация распространена среди пожилого и старческого возраста, однако скудные данные литературы, если и описывают ее, то, как правило, без учета возрастного аспекта – в основном для организмов молодого и зрелого возраста. При старении многие реакции изменены вплоть до противоположного знака, поэтому особое значение приобретает исследование механизмов естественной или искусственной адаптации, их стимуляция в нужном направлении. С этой точки зрения проделанная Щербаковым Д.Л. работа приобретает еще и социальное значение.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Значительный объем исследования, использование общепринятых экспериментальных моделей иммобилизационного стресс-воздействия и инкубации клеток *in vitro*, применение комплекса биохимических методов оценки показателей

перекисного окисления липидов, антиокислительной активности, а также использование интегрального математического показателя для системного анализа полученных результатов с адекватной статистической обработкой, позволяют говорить о высокой степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Задачи исследования полностью согласуются с его целью.

Полученный материал обобщен в виде трех положений, выносимых на защиту, и пяти выводов, в которых отражены конкретные возрастные особенности влияния вегетативной нервной системы на свободно-радикальный статус организма в норме и при иммобилизационном стрессе, а также при коррекции комбинацией L-триптофана с никотиновой кислотой, что имеет несомненное важное значение для физиологии и биохимии.

**Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Результаты, полученные в диссертационной работе Щербакова Д.Л., а также выводы и рекомендации, сформулированные автором, обладают необходимой степенью достоверности и научной новизны. Дизайн исследования полностью соответствует поставленной цели и сформулированным задачам. Применение общепринятой модели стресс-воздействия (иммобилизация), а так же модели по инкубации клеток *in vitro*, в совокупности с современными биохимическими и морфологическими методами исследования, позволили автору выявить возраст-зависимые различия во влиянии медиаторов симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы на свободно-радикальные процессы в системе крови и показать антиоксидантное действие комбинации L-триптофана и никотиновой кислоты.

Несомненной заслугой автора является разработка и применение математического системного подхода по объединению экспериментальных биохимических показателей (ПОЛ и АОА) в единую интегральную величину, что облегчило интерпретацию и повысило достоверность анализа полученного материала. Обоснованность и достоверность результатов

исследования подтверждается адекватной статистической обработкой данных, полученных на 410 крысах-самцах линии Вистар зрелого (8–10 месяцев) и старого (19–22 месяца) возрастов, наличием исследуемых и контрольных групп животных в динамике развития стресс реакции. Статистический анализ данных был проведен с использованием параметрических (t-критерий Стьюдента) и непараметрических (U-критерий Манна–Уитни) критериев статистики, что вполне соответствует решению поставленных задач в диссертационной работе. Исследования проводились на современной аппаратуре и широко апробировались на научных и научно-практических форумах, включая российский и международный уровень.

Автором было подтверждено, что иммобилизационное стресс-воздействие вызывало фазные изменения процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в системе крови крыс, которые соответствовали стадиям стресс-реакции, с увеличением возраста у старых крыс активация перекисного окисления липидов происходила значительно раньше, чем у зрелых крыс. Автором впервые был зарегистрирован феномен индуцирующей роли адреналина и ацетилхолина в активации перекисного окисления липидов в межклеточной среде костного мозга с последующим его усилением в миелокариocyтах и периферической крови. Впервые показано, что при стресс-воздействии в системе крови крыс адреналин приводил к ускорению активации процессов перекисного окисления липидов и антиокислительной активности, а ацетилхолин вызывал замедление. В исследованиях *in vitro* впервые показано, что с возрастом уменьшался вклад парасимпатической нервной системы и увеличивался вклад симпатической нервной системы в активацию перекисного окисления липидов в миелокариocyтах. Впервые были продемонстрированы антиоксидантные свойства сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты: действуя на метаболизм L-триптофана, она увеличивала неферментативную антиокислительную защиту организма крыс, особенно в зрелом возрасте. Впервые выявлено гиподипидемическое действие сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты в условиях стресса, особенно в старом возрасте.

**Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.** Исследования, выполненные на лабораторных животных – интактных крысах зрелого и старого возраста, не позволили автору обнаружить надежных различий во вкладе системы перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в деятельность нейромедиаторного аппарата вегетативной нервной системы при физиологическом старении. Поэтому диссертант воспользовался хорошо известным в науке методом – воспроизведения иммобилизационного стресс воздействия у экспериментальных животных в идентичных условиях (в качестве нагрузочной пробы или другими словами – выведение системы из равновесного состояния). Это, как и следовало ожидать, позволило выявить существенные, но зачастую непринципиальные или непонятные автору (нелогичные) различия у старых животных по сравнению с молодыми в пределах изучаемых клеточно-метаболических систем. Они приобрели научно-практическую значимость, устойчивость (повторяемость) при наложении воздействия и уже на этом этапе, не вызывающем сомнений, были подтверждены актами внедрения в учебный процесс на кафедрах ВУЗов физиологической направленности. Факты, полученные автором, о которых написано в разделе «научная новизна», нуждались в теоретическом обосновании или объяснении. Как представляется, именно с этой целью – расшифровки полученных возраст-зависимых различий функционирования нейромедиаторного отдела вегетативной нервной системы и некоторых принципиально по-разному связанных с ними органов (клетки костного мозга, печень, ткань головного мозга, периферическая кровь) - автор прибег к коррекции зафиксированных изменений сочетанием триптофана и никотиновой кислотой. Это позволило автору углубленно проанализировать полученный материал, из которого вытекают полученные выводы, соответствующие цели и задачам и были сформулированы 3 положения, выносимые на защиту.

**Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.** Весьма впечатляет, что в теоретической работе по

специальности физиология обоснованно присутствует раздел **«практические рекомендации»**, из которого вытекают важные для современной медицины практические выводы, позволяющие подойти к диагностике, пониманию и решению проблемы более ранней активации энтропийного свободно-радикального процесса при стрессе у пожилых пациентов, находящихся в состоянии вынужденной иммобилизации, длительного постельного режима (травмы, постинсультные и постинфарктные состояния). Отдельного внимания заслуживает изучение автором геропротективного, гиполипидемического и антиоксидантного эффекта комбинации L-триптофана и никотиновой кислоты с подробным биохимическим обоснованием, что имеет не только теоретическое, но и перспективное практическое значение для коррекции активации перекисного окисления липидов вызванного иммобилизацией или гиподинамией.

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедрах патологической физиологии и биохимии ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, в научно-исследовательской деятельности лаборатории антивозрастных технологий ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» (г.Екатеринбург).

**Оценка содержания и завершенности диссертации.** В целом диссертация написана по традиционному плану, изложена на 168 страницах текста, содержит 42 таблицы и 27 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав собственных исследований, выводов, заключения и списка литературы, включающего 186 отечественных и 145 иностранных публикаций.

Во введении процитировано достаточное количество научной литературы, преимущественно за последние 5 -7 лет, по теме, из которой автор делает важные выводы: 1. Для физиологии животных старшего возраста не ясна роль перекисного окисления липидов и антиокислительной активности, а также функционирования нейромедиаторов, их взаимодействия в вегетативной нервной системе 2.Описанная ситуация

представляется неразработанной при патологическом старении – иммобилизационном стрессе. 3. Вопрос коррекции системы перекисное окисление - антиокислительная активность при иммобилизационном стрессе не только не разработан, особенно в возрастном аспекте, но даже не поставлен. Отсюда логично вытекает цель настоящего исследования, раскрываемая с четко сформулированными соответствующими ей задачами.

Глава 1 – Обзор литературы. Начинается кратким изложением современных представлений о перекисном окислении липидов и антиокислительной активности как таковых. Затем излагаются современные данные о поведении системы при экстремальных состояниях и, насколько это возможно, поскольку литература скудна и противоречива – какие изменения система претерпевает при старении. Рассматривается иммобилизация, как разновидность экстремального психоэмоционального стресс-воздействия у животных и человека. Затем следует анализ адренергической и холинергической регуляции, в том числе приводится небольшое число работ, касающихся развития стресс-реакции у старых животных. Глава завершается обсуждением возможности коррекции иммобилизационного стресса различными способами, где автор на основе данных литературы избирает способ, представляющийся ему оптимальным – совместное введение триптофана и никотиновой кислоты с целью увеличения синтеза мелатонина.

Глава 2 – Методические вопросы исследования. Содержит описание современных и адекватных задачам методов исследования. Работа была проведена на 410 крысах-самцах линии Вистар зрелого (8–10 месяцев, массой 200–250г) и старого (19–22 месяца, массой 350–500г) возрастов. Работа с животными проводилась в строгом соответствии со всеми отечественными и зарубежными регламентирующими документами. Детально описана методика воспроизведения иммобилизационного стресса, введения нейромедиаторов, триптофана и никотиновой кислоты. А также методика инкубирования миелокариоцитов с адреналином и ацетилхолином *in vitro*, получение периферической крови, миелокариоцитов и гомогенатов органов крыс. Оценка перекисного окисления липидов и антиокислительной

активности проводилась по комплексу стандартных методов, которые потом интегрировались единым математическим методом. Достоинством такого подхода является простота трактовки полученных результатов, недостатком – невозможность оценки вклада какого либо метаболита в процесс в целом. Для доказательства развития стресс-реакции производилось морфологическое исследование надпочечников, чего явно не достаточно, тем более, эти результаты не вошли в диссертацию. Достоинством работы явилось адекватное использование статистических приемов – были привлечены как непараметрические, так и параметрические методы анализа.

Глава 3 – посвящена изучению изменения перекисного окисления липидов и антиокислительной активности у крыс зрелого и старого возраста при иммобилизационном стресс-воздействии. Цифровой и удачно выполненный графический материал убеждает, что при иммобилизационном стресс-воздействии процессы перекисного окисления липидов и антиокислительной активности в системе крови крыс изменяются в зависимости от стадий стресс-реакции, при этом у старых крыс изменения активности процессов перекисного окисления липидов происходят на 3-6 часов раньше, чем у зрелых, что, возможно, связано с возраст-зависимым уменьшением эффективности неферментативной антиокислительной системы.

Глава 4 – посвящена изучению влияния нейромедиаторов вегетативной нервной системы на перекисное окисление липидов и антиокислительную активность у крыс зрелого и старого возраста при иммобилизационном стресс-воздействии. К такому приему «усиления» отдельных звеньев нервной системы пришлось прибегнуть в связи с относительной скудностью данных, полученных в предыдущей главе. И замысел автора начал оправдываться. В эксперименте при стрессе нейромедиаторы вегетативной нервной системы оказывают влияние на изменение интенсивности процессов перекисного окисления липидов; адреналин при иммобилизационном стресс-воздействии в системе крови крыс способствует быстрому и более значимому увеличению интенсивности процессов перекисного окисления липидов, а ацетилхолин – более продолжительному, но менее значимому изменению перекисного

окисления липидов. С увеличением возраста у крыс наблюдается ослабление влияния парасимпатического отдела вегетативной нервной системы (ацетилхолин) и усиление симпатического отдела вегетативной нервной системы (адреналин) на изменения интенсивности процессов перекисного окисления липидов, что способствует более ранней активации этих процессов при иммобилизационном стресс-воздействии в системе крови старых крыс и снижению пролиферативного потенциала костного мозга при старении.

Глава 5 - содержит данные о влиянии комбинации L-триптофана и никотиновой кислоты на перекисное окисление липидов, антиокислительную активность и липидно-липопротеиновый состав у зрелых и старых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии. Автору удалось показать, что сочетание L-триптофана и никотиновой кислоты в условиях иммобилизационного стресс-воздействия вызывает снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в системе крови и органах крыс, проявляя антиоксидантные свойства, при этом с увеличением возраста у старых крыс происходит уменьшение антиокислительной эффективности сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты. Иммобилизационное стресс-воздействие вызывает негативные гиперлипидемические изменения в периферической крови крыс старого возраста, но в условиях воздействия сочетания L-триптофана и никотиновой кислоты наблюдается нормализация липидного и липопротеинового состава крови, свидетельствует о геропротекторных, гиподипидемических свойствах этого сочетания.

Выводы диссертации вытекают из полученных автором данных, что свидетельствует о достижении автором цели и задач исследования; сформулированы без замечаний. Положения, выносимые на защиту, представляют собой наиболее доказательную часть выводов и также полностью соответствуют содержанию диссертации.

**Публикации основных результатов диссертационной работы.** По теме диссертации опубликовано 20 работ из них 4 публикации в изданиях рекомендованных ВАК. Получено положительное решение о выдаче патента на промышленный образец (заявка № 2014504302 от 2014 года, схема

«Возрастные особенности участия симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы в изменении интенсивности процессов ПОЛ системы крови крыс при иммобилизационном стресс-воздействии»).

Автореферат отражает содержание диссертации, весьма удачно проиллюстрирован.

**Вопросы к диссертанту.** Принципиальных замечаний по диссертации нет, но вместе с тем возникает несколько вопросов:

1. В чем, по Вашему мнению, преимущество использования интегральных коэффициентов показателей перекисного окисления липидов и антиокислительной активности?

2. Считаете ли Вы достаточным диагностику развития стресс-реакции по одному показателю, учитывая, что смотрели Вы довольно длительный участок стресса и отчасти в динамике?

3. Благодаря чему в организме крыс происходит снижение величины липопротеинового коэффициента при воздействии комбинации L-триптофана и никотиновой кислоты?

4. Что по Вашему мнению является инициатором процессов ПОЛ у стрых крыс при иммобилизационном стресс-воздействии?

Высказанные мной пожелания по ходу анализа диссертационной работы не умаляют значимости данного диссертационного исследования.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационное исследование Щербакова Дениса Леонидовича по теме: «Влияние нейромедиаторов на перекисное окисление липидов и антиокислительную активность при иммобилизационном стресс-воздействии у крыс разного возраста», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология, является самостоятельно выполненной, завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных результатов содержится решение актуальной научной задачи в области физиологии о конкретных возрастных особенностях функционирования нейромедиаторов,

перекисного окисления липидов и антиокислительной активности при выведении организма из состояния покоя иммобилизационным стрессом, модификации этого состояния введением нейромедиаторов триптофаном с никотиновой кислотой, что имеет важное значение для физиологической науки. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, работа соответствует критериям параграфа II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Щербаков Д.Л. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01- физиология.

Официальный оппонент,  
заведующий кафедрой биохимии ФГБОУ  
ВПО «Уральский государственный  
университет физической культуры»  
Министерства спорта Российской Федерации  
доктор мед. наук, профессор

Е.И. Львовская

Подпись профессора Е.И. Львовской заверяю,  
Начальник отдела кадров  
ФГБОУ ВПО "Урал ГУФК»

Е.Е. Никитина

454090, Челябинск, ул. Орджоникидзе, 1

ФГБОУ ВПО «УралГУФК» +7(351) 237-05-66, lvovskaya@mail.ru

Отзыв официального оппонента поступил « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г

Ученый секретарь Совета Д004.027.01

И.А. Тузанкина

С отзывом официального оппонента ознакомлен « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г

Соискатель

Д.Л. Щербаков