

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Золотухина Петра Владимировича «Особенности окислительного статуса и регуляции транскриптома в процессе беременности», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Изучение молекулярных закономерностей развития физиологической беременности и особенностей их нарушения при основных патологических отклонениях течения беременности остается одной из актуальнейших проблем российской медицины, имеющей особую социальную значимость. Это обусловлено тем, что в Российской Федерации показатель материнской смертности в 1,5 раза выше соответствующего показателя в развитых западноевропейских странах, а показатель младенческой смертности превышает соответствующие показатели Германии и Бельгии в 2,3 раза, Великобритании на 40%. И даже после реализации Программы правительства РФ от 9 декабря 2013 г. по развитию перинатальных центров показатели материнской и младенческой смертности в 2018 г. в нашей стране будут превышать западноевропейский уровень в 1,3-2,2 раза.

В последние годы широко обсуждалась возможность выделения отдельной группы так называемых «свободнорадикальных патологий», при которых развитие окислительного стресса является важным патогенетическим фактором возникновения болезни или нарушения нормального функционирования организма. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить ведущую роль нарушения свободнорадикальных процессов и при патологии беременности. Однако комплексные, интегральные исследования этих аспектов на современном методическом уровне до настоящего времени отсутствовали. Не менее важно изучение роли свободнорадикального окисления на разных этапах физиологически развивающейся беременности. Это обуславливает несомненную актуальность данной диссертационной работы.

Следует отметить, что в отличие от большинства исследований, в которых оцениваются отдельные показатели СРО (основные молекулярные продукты окисления, активность антиоксидантных ферментов), автор подошел к планированию работы с позиций системной клеточной биологии, позволяющих учитывать роль большого числа различных регуляторных контуров, часть из которых может дифференцированно влиять на окислительный статус в зависимости от состояния клетки или организма. Следуя принципам системной биологии, П.В. Золотухин впервые попытался осуществить интегральный анализ особенностей окислительного статуса организма в процессе беременности с учетом присущей ему многокомпонентности, наличия прямых и обратных связей, а также разнородности экспериментальных данных, как имеющихся в литературе,

так и собственных. При этом следует отметить, что данная работа отличается от большинства проводимых медико-биологических исследований тем, что в ней основное внимание уделено изучению закономерностей изменения окислительного статуса при физиологической, нормально развивающейся беременности, а данные полученные при различных патологиях гестации использованы как группы сравнения, позволяющие глубже понять механизмы молекулярно-генетических и биохимических процессов, определяющих течение физиологической беременности.

Диссертация, как при описании результатов исследования, так и их обсуждении, четко подразделяется на четыре раздела: 1) создание и анализ карты интерактома окислительного статуса человека; 2) окислительный статус на разных этапах физиологически протекающей беременности; 3) окислительный статус при дисфункциональных отклонениях течения беременности; 4) анализ транскриптома при патологиях беременности – в хорионе и эндометрии в первом триместре и в плаценте в третьем триместре. Если результаты исследования антиоксидантной и прооксидантной систем при физиологической и осложненной беременности, представленные во 2-ом и 3-ем разделах, четко дополняют и поясняют друг друга, то разделы, посвященные интерактому окислительного статуса человека и транскриптому экстраэмбриональных тканей при патологиях беременности, могли быть предметом отдельных исследований. Однако автору удалось соединить все представленные в работе данные в единое логично построенное и обсужденное диссертационное исследование.

Таким образом, **актуальность избранной диссертантом темы, логичность и завершенность диссертационной работы** не вызывают сомнения.

Диссертационная работа написана в традиционном стиле, изложена на 177 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: общую характеристику работы (10 стр.), обзор литературы (30 стр.), главу 2 с описанием организации и методов исследования (17 стр.), главу 3 с результатами собственных исследований (27 стр.), главу 4 – обсуждение результатов (25 стр.), 4 вывода и 5 пунктов практических рекомендаций. Основная часть работы содержит 16 таблиц и 32 рисунка. Указатель литературы включает 233 источника, из которых лишь 23 отечественных и 210 зарубежных. В четырех приложениях (34 стр.) представлены контроль качества транскриптомного исследования, иллюстрированный 8 рисунками, рисунок с картой интерактома окислительного статуса человека и 3 таблицы, занимающие 25 страниц, с результатами транскриптомного исследования хориона.

В общей характеристике работы отражены все необходимые позиции. Обзор литературы состоит из трех подразделов. В первом подразделе автор представил

современное понимание концепции окислительного статуса клетки и организма; описал источники продукции активных форм кислорода, их функциональную значимость в клеточной сигнализации; каскады, чья активность взаимосвязана с состоянием систем окислительного статуса, а также каскады антиоксидантной защиты и их основные функциональные компоненты. Второй подраздел посвящен вовлечению окислительного статуса и его систем в течение беременности у человека - как физиологическое, так и с дисфункциональными отклонениями на разных сроках. В третьем подразделе обзора литературы описываются современные подходы системной биологии и молекулярной физиологии клетки, которые позволили получить данные о взаимосвязях отдельных компонентах клетки, и благодаря этому перейти к созданию интерактивных карт клетки и применению их при масштабных исследованиях, таких, как полногеномное транскриптомное профилирование тканей, которые и было проведено в диссертационном исследовании соискателя. Вопросы, освещенные в обзоре, полностью соответствуют теме и задачам диссертации, хорошо обосновывают необходимость проведения исследований именно в выбранных автором направлениях, и весь обзор в целом, несомненно, свидетельствует об очень хорошем знании современной литературы по рассматриваемым вопросам. Обзор написан на основе новейшей литературы и, на наш взгляд, может быть полезен специалистам, занимающимся выше упомянутыми актуальными проблемами биологии и медицины.

Во второй главе "Организация и методы исследования" описаны группы обследованных участниц, их анкетные, анамнестические, антропологические данные, предварительные статистические выкладки, подтверждающие правомочность дальнейших исследований; алгоритм создания карты интерактома окислительного статуса и ее техническое описание; подробное описание использованных биохимических методов, в том числе характеристика принципиальных особенностей хемилюминесцентного анализа; детальные данные о транскриптомном исследовании; полный перечень использованных статистических критериев и перечисление технических средств, с помощью которых производились статистические расчеты. Все использованные в диссертации методы исследования современны и адекватны поставленным задачам.

Результаты собственных исследований представлены в главе 3, состоящей из 4 подразделов в соответствии с вышеперечисленными основными составляющими данного диссертационного исследования. Анализ имеющихся баз данных позволил автору разработать карту интерактома окислительного статуса человека на клеточном уровне. Продуманным и обоснованным представляется выбор в качестве ее ключевого звена одного из центральных антиоксидантных транскрипционных факторов ядерного фактора



2 (NFE2L2 – фактор, родственный ядерному эритроидному фактору 2). Известно, что индукция этого фактора под действием АКМ приводит к возбуждению транскрипции более 200 генов, ответственных за синтез основных антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, а также гемоксигеназы-1 (HO-1) и ферментов семейства оксидоредуктаз. С учетом разработанной карты автор аргументированно выбирает для исследования у женщин, находящихся на разных стадиях беременности, хемилюминесцентный анализ, позволяющий интегрально оценить интенсивность свободнорадикальных процессов и состояние антиоксидантной системы, а также содержание в крови мочевой кислоты, гомоцистеина и тиоредоксина, являющихся компонентами ключевых биохимических каскадов, определяющих редокс-потенциал клеток и организма в целом.

Следует отметить продуманность выбора алгоритма проведения экспериментальной части исследования. Изучение показателей окислительного статуса проведено при физиологическом течении гестации в первом, втором и третьем триместрах, и при основных патологиях беременности: спонтанном аборте и неразвивающейся беременности в первом триместре, истинной угрозе прерывания беременности (истмико-цервикальной недостаточности) во втором триместре и тяжелом гестозе в конце третьего триместра. Проведенный на высоком уровне корреляционный анализ позволил автору оценить значимость и взаимовлияние компонентов окислительного статуса в динамике физиологически протекающей беременности, а также предположить роль их нарушений при основных осложнениях гестации. Показана высокая информационная ценность для практической медицины использованных в работе индексов: индекса МГК, отражающего соотношение мочевой кислоты и гомоцистеина и индексов М/50 и М/S, используемых при хемилюминесцентном анализе для оценки эффективности работы антиоксидантной системы, а также определения тиоредоксина.

В результате проведения анализа транскриптома экстраэмбриональных тканей автору не удалось выявить значимых отличий в тканях эндометрия при физиологическом течении беременности и ее патологиях. В то же время установлено, что в тканях плацент при тяжелом гестозе и хорионов при самопроизвольном аборте значительно повышена экспрессия ядерного фактора 3, а экспрессия NFE2L1 напротив снижена при тяжелом гестозе. Это свидетельствует о нарушении регуляции клеточных систем, контролируемых этими ядерными факторами, при дисфункциональных нарушениях беременности.

В обсуждении автор вполне оправданно и убедительно делает акцент на значимость биохимических каскадов, способствующих образованию супероксид-анион-радикала и пероксинитрита, наиболее реакционно способных АФК, приводящих к

деструктивным изменениям компонентов клетки. Также проанализирована роль прооксидантного комплекса, включающего НАДФ•Н-оксидазы, ксантиноксидоредуктазу, редокс-чувствительный транскрипционный ядерный фактор «каппа-би» (NF- $\kappa$ B), и показана значимость мочевой кислоты и гомоцистеина в его функционировании. Особое внимание уделено тиоредоксину, и на основе анализа, как данных литературы, так и результатов собственных исследований постулирована его ключевая роль в регуляции окислительного статуса.

Новизна проведенного исследования и полученных результатов определяется, прежде всего, тем, что автором впервые с позиций системной биологии проведен системный анализ некоторых сторон происходящих при физиологической беременности изменений окислительного статуса. При этом для выбора информативных маркеров и повышения информативности анализа проводимых биохимических и транскрипторных исследований автор использовал разработанную им интерактивную схему биологического статуса человека.

Следует отметить адекватность и четкость формулирования основных положений, выносимых на защиту. Выводы также полностью соответствуют полученным автором результатам и отражают сущность работы. Практические рекомендации обоснованы.

Таким образом, **обоснованность и достоверность результатов диссертационной работы, сформулированных автором выводов и положений, выносимых на защиту**, вытекают из высокого методического уровня с использованием современных научных подходов, тщательности проведенного исследования, его комплексности и многоплановости, уровня статистической обработки полученных данных и анализа результатов, основанного на превосходном знании новейшей литературы.

Работа, несомненно, имеет как научную, так и практическую значимость.

Диссертация тщательно оформлена, практически идеально выверена, почти не содержит опечаток и погрешностей в представлении материала.

В качестве **непринципиальных замечаний** можно отметить следующее.

Карта интерактома окислительного статуса человека, представленная в приложении 2, и тем более в основной части диссертации (с. 65) является нечитаемой из-за величины шрифта.

В табл. 11 (с. 82) ошибочно указано отсутствие отличий по одному показателю.

Не удачным на наш взгляд является часто использованное словосочетание «делает вклад», лучше было бы «вносит вклад».

В разделе 4.3 при обсуждении особенностей окислительного статуса при осложнениях первого триместра беременности следовало назвать эти дисфункциональные

отклонения, а не просто говорить о группах сравнения 1 и 2 (с. 105). В этом же разделе замечено несколько опечаток (с.108-110).

Выводы слишком объемны, особенно четвертый, занимающий почти страницу, т.е. представляет фактически полноценные тезисы на конференцию.

Принципиальных замечаний нет. У меня не возникло и вопросов для обсуждения на защите, поскольку автор всесторонне обсудил все полученные им данные и их вклад в понимание проблемы. При этом хочу отметить, что в обсуждении при сопоставлении полученных данных с имеющимися в литературе сведениями выпукло обозначена новизна собственных исследований в каждом конкретном случае.

По материалам диссертации опубликовано 39 научных работ, в том числе 12 статей в журналах из перечня ВАК, из которых 4 в зарубежных журналах. Результаты работы были представлены на 17 конференциях и форумах, подавляющее большинство которых международные или с международным участием.

#### **Заключение.**

По актуальности темы, объему проведенных исследований, методическому уровню, несомненной новизне, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Золотухина Петра Владимировича полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология».

Оппонент

Доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории  
изучения патогенеза злокачественных опухолей  
ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский  
онкологический институт" Минздрава России  
2 декабря 2014 г.



И.А. Горошинская

Подпись профессора И.А. Горошинской заверяю.  
Начальник отдела кадров РНИОИ



Н.С. Колесникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России); 344037, г. Ростов - на - Дону, 14-я линия, 63; тел.: +79185413946; e-mail: rni oi@list.ru; web-сайт: www.rni oi.ru