

ОТЗЫВ

официального оппонента Мазо Владимира Кимовича доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи на диссертационную работу Екатерины Андреевны Беловой «Полифенольные экстракты плодов северных ягод рода *Vaccinium* как корректоры патофизиологических процессов при экспериментальном метаболическом синдроме», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Диссертационная работа, выполненная Екатериной Андреевной Беловой, представляет собой исследование в области патологической физиологии соответствующее паспорту специальности **3.3.3.** в части (1).

Актуальность исследования. Диссертационное исследование Е.А. Беловой посвящено важной научной и практической проблеме клинической нутрициологии, а именно, характеристике минорных биологически активных веществ (БАВ) пищи, способствующих профилактике и диетической коррекции нарушений углеводного обмена. Нарушения углеводного обмена ведут к развитию ряда алиментарно-зависимых патологий, в первую очередь, таких социально-значимых как сахарный диабет 2 типа, ожирение, метаболический синдром (МС). Профилактика и диетотерапия указанных заболеваний и их клинических проявлений предполагают включение в рационы питания лиц, входящих в соответствующие группы риска указанных заболеваний, специализированных пищевых продуктов (СПП), эффективность которых определяется наличием в их составе функциональных пищевых ингредиентов, содержащих минорные БАВ пищи, проявляющих гипогликемическое и/или гипополипидемическое действие. Вышеизложенное подтверждает актуальность диссертационной работы Екатерины Андреевны Беловой «Полифенольные экстракты плодов северных

ягод рода *Vaccinium* как корректоры патофизиологических процессов при экспериментальном метаболическом синдроме», целью которой явилась физиолого-биохимическая оценка как *in vitro*, так и *in vivo* (с использованием разработанной соответствующей модели) возможностей коррекции основных патофизиологических компонентов метаболического синдрома полифенольными экстрактами плодов ягод рода *Vaccinium*.

Новизна исследования. В исследовании Е.А. Беловой получены результаты, отвечающие критериям научной новизны. В первую очередь это модифицированная и верифицированная модель экспериментального метаболического синдрома у лабораторных грызунов (самок крыс линии Вистар), дополнительно характеризуемая проявлениями остеопороза, сахарного диабета и артериальной гипертензии. Использование этой модели позволило диссертанту впервые дать сравнительную оценку и комплексно охарактеризовать антиоксидантные гипогликемические, гиполипидемические, гипохолестеринемические и антигипертензивные свойства экстрактов плодов клюквы, черники, брусники и их влияние на стеатогепатоз.

В диссертационной работе на клеточных культурах (альвеолярные макрофаги кролика и перевиваемая культура эпителиальных клеток НЕК293-клеток почки эмбриона человека) впервые установлены цитопротекторная и противовоспалительная активность экстрактов ягод клюквы, черники, брусники, произрастающих в Северо-Западном регионе Сибири.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Полученные в рамках проведенного исследования данные представляют существенный научный интерес для экспериментальной патофизиологии и одновременно имеют значительную практическую значимость для клинической нутрициологии. Вопрос о том, в какой степени полученные результаты на биомоделях можно экстраполировать на организм человека, является одновременно и важнейшим и сложнейшим при экспериментальном моделировании с использованием лабораторных животных. Прогресс

молекулярной биологии позволил использовать в экспериментальной медицине трансгенных и нокаутных животных, однако вопрос об адекватном отражении той или иной экспериментальной биомоделью патологических процессов, протекающих в организме человека при метаболическом синдроме, остается открытым для подавляющего большинства моделей. Оценка адекватности экспериментальных биомodelей представляет собой систему доказательств, свидетельствующих, что полученные результаты на животных могут быть экстраполированы на человека с определенной степенью вероятности. Разработанная в диссертационной работе Е.А. Беловой модифицированная модель метаболического синдрома на крысах, включающая такие его проявления, как ожирение, триглицеридемию, гиперхолестеринемию, стеатогепатоз, инсулинорезистентность, артериальную гипертензию и остеопороз, по мнению оппонента может найти свое эффективное применение в экспериментальной патофизиологии. Профилактическое действие минорных БАВ пищи должно подтверждаться с позиций доказательной медицины и этом плане разработанная модель представляется весьма востребованной при проведении доклинических исследований эффективности специализированной пищевой продукции, предназначенной для диетической профилактики и/или коррекции нарушений углеводного и/или липидного обмена.

Структура диссертационного исследования

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в работе, описания результатов исследования, обсуждения полученных результатов и заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, а также списка использованных литературных источников. Текст диссертации изложен на 174 печатных страницах, включая 66 рисунков, 26 таблиц. Список литературы содержит 301 литературный источник (75 опубликованы в отечественной и 226 в зарубежной научной печати). В разделе «Введение» Екатериной Андреевной Беловой сформулировала вышеназванную цель

диссертационной работы и задачи исследования, основные из которых перечислены ниже. 1. Модификация модели экспериментального метаболического синдрома у лабораторных грызунов (крыс - самок линии Вистар), дополненная проявлениями остеопороза, сахарного диабета и артериальной гипертензии. 2. Сравнительная характеристика состава полифенольных экстрактов плодов ягод рода *Vaccinium* (клюквы обыкновенной, черники обыкновенной, брусники обыкновенной), произрастающих в Сургутском районе Ханты-Мансийского округа Тюменской области Российской Федерации. 3. Оценка *in vitro* влияния экстрактов ягод рода *Vaccinium* на изолированные клетки в тестах антиоксидантной, цитопротекторной и противовоспалительной активности. 4. Характеристика *in vivo* влияния экстрактов ягод рода *Vaccinium* на выраженность основных патофизиологических проявлений метаболического синдрома: ожирение, дислипидемию, инсулинорезистентность, гипергликемию, артериальную гипертензию, остеопороз и стеатогепатоз.

Обзор и анализ научной литературы. Методическую и экспериментальную часть работы предваряет подробный обзор научных публикаций (глава 1, стр. 11-37), посвященный патофизиологии метаболического синдрома. Автором диссертации обсуждаются распространенность метаболического синдрома, его этиология и патогенез, а также обсуждаются возможные пути воздействия на патогенетические факторы метаболического синдрома. В разделе обзора, посвященном характеристике полифенольных соединений северных ягод - рода *Vaccinium*, обосновывается и высказывается предположение о перспективности их использования для диетической коррекции метаболического синдрома.

Материалы и методы исследования представлены во второй главе диссертации (стр. 38-51) и свидетельствуют о современном методическом уровне исследования. Экспериментальные исследования выполнены *in vivo* на 159 половозрелых крысах-самках Wistar массой 180-320 г (возраст 6 – 8 мес.) и на 5 кроликах шиншилла, массой 3,0-3,2 кг. Животные содержались в

стандартных условиях в соответствии с правилами, утверждёнными ГОСТ Р 53434-2009 г. Исследования были проведены согласно Национальным общим этическим принципам экспериментов на животных. На выполнение данной работы было получено разрешение локального Биоэтического комитета Медицинского института Сургутского государственного университета. На первом этапе проведения экспериментов *in vivo* моделирование метаболического синдрома у крыс-самок линии Вистар было проведено достаточно традиционно путем использованием в качестве питья в течение 8 недель 20% раствора фруктозы (раздел 2.9). Водно-спиртовые экстракты плодов ягод получены в соответствии с Государственной Фармакопеей РФ и стандартизованы по общему содержанию полифенолов. Полифенольный профиль плодов ягод охарактеризован методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для оценки влияния экстрактов плодов ягод **рода Vaccinium** на выраженность основных патофизиологических проявлений у самок-крыс линии Вистар была разработана и осуществлена модифицированная модель метаболического синдрома, позволяющая получить в дополнение к стандартным показателям метаболического синдрома включавшим нарушение липидного обмена, ожирение, инсулинорезистентность, артериальную гипертонию, дополнительно остеопороз, стеатогепатоз и выраженную гипергликемию.

Исследуемые экстракты плодов северных ягод вводили в течение 2 недель интрагастрально с помощью желудочных зондов в течение 2 недель. Эффект оценивался в сравнении с плацебо.

Во всех случаях животных выводили из эксперимента путем эвтаназии с использованием двуокиси углерода. Определение уровня свободных радикалов проведено стандартными методами с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил радикала (DPPH радикала) и 2,2'-Азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) катион радикала (ABTS• +). Изменения жизнеспособности изолированных клеток (первичная культура альвеолярных макрофагов кроликов или перевиваемая культура

эпителиальных клеток HEK293-(клеток почки эмбриона человека) определены стандартно с использованием тиазолил синий тетразолий бромида (MTT тест). Для выделения ДНК использована клеточная линия RAW 264.7 и полученная ДНК амплифицирована методом количественного ПЦР. Плотность костной ткани изучена на приборе Ivis Spectrum CT, PerkinElmer, USA. Проведен морфологический анализ костной ткани, ткани миокарда и ткани печени. Уровень гликемии определен с помощью глюкометра «Gamma Mini». Толерантность к инсулину исследована путем определения концентрации глюкозы глюкозо-оксидазным методом. С помощью компьютерной программы Bordgia 1.03 рассчитана интегральная площадь под фармакокинетической кривой) по методу наименьших квадратов от 0 до 120 минут. Морфологическое исследование проведено в варианте световой микроскопии с окраской гистологических препаратов гематоксилином и эозином с последующей морфометрией. Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета программ «Statistica 6.0» и использованием непараметрические методов медико-биологической статистики. Уровень статистической значимости различий средних арифметических (при параметрической обработке) или медиан (для непараметрических критериев) принимался равным 0,05.

Результаты проведенных исследований представлены в третьей, четвертой и пятой главах диссертации. На первом этапе исследований *in vivo* была осуществлена попытка моделирования метаболического синдрома у крыс путем замены воды 20% раствором фруктозы на фоне стандартной диеты (раздел 2.9). В таблице 2 (стр. 57) приведены метаболические параметры, свидетельствующие о возможности такого получения модели метаболического синдрома. Однако была установлена избыточная токсичность длительной замены воды высококонцентрированным (20%) раствором фруктозы, что определило необходимость существенной модификации модели метаболического синдрома. В этой связи во второй серии экспериментов (3 глава), была воспроизведена модифицированная

модель метаболического синдрома. Контрольную группу составили 12 интактных крыс, находящихся на стандартной диете вивария, и, не подвергавшихся каким-либо воздействиям. 12 самкам под эфирным наркозом была проведена двусторонняя овариэктомия. Через неделю им назначена диета с повышенным содержанием жира и в качестве источника избыточного количества углеводов использован раствор 10 % фруктозы (в течение 8 недель). Все метаболические параметры через 8 недель диеты у овариэктомизированных крыс (таблица 3), а именно: развитие инсулинорезистентности (таблица 4), высокое артериальное давление (таблица 5), гистологические исследования тканей миокарда, почек, печени, поджелудочной железы и морфометрия жировой ткани убедительно свидетельствовали об обоснованности и перспективности использования разработанной модели метаболического синдрома для тестирования возможных корректирующих эффектов биологически активных веществ пищи. В главе 4 (стр. 70-87) представлены результаты хроматографического определения состава тестируемых полифенольных экстрактов ягод и охарактеризованы антиоксидантные, цитопротекторные и противовоспалительные эффекты, проявляемые этими экстрактами в опытах *in vitro*. Общее среднее содержание полифенольных соединений в экстрактах ягод было максимальным для черники, наименьшим для клюквы и для брусники. В работе также был охарактеризован полифенольный профиль всех трех экстрактов плодов ягод рода *Vaccinium*. Оценка антирадикальной активности была проведена с использованием экстрактов ягод с «выравненным» общим содержанием полифенолов. Наибольшую нейтрализацию DPPH-радикала и ABTS+ радикала оказывал экстракт ягод черники. В тесте МТТ все экстракты в разведениях 1:100 не проявляли цитотоксического действия, а, напротив, способствовали сохранению жизнеспособности эпителиальных клеток перевиваемой клеточной культуры клеток НЕК293-клеток почки эмбриона человека, как это было показано в экспериментах с доксорубицином. Ситуация с жизнеспособностью

альвеолярных макрофагов кролика в тесте МТТ была аналогичной. Возможные проявления противовоспалительного действия экстрактов *in vitro* выявлены в тесте с ингибированием экспрессии генов воспалительных биомаркеров в ЛПС-стимулированных RAW264.7 макрофагах. Присутствие экстрактов в среде культивирования ЛПС стимулированных макрофагов приводило к снижению экспрессии генов, отвечающих за продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6.

Не снижая значимости представленных выше результатов сравнительной оценки полифенольного профиля исследованных экстрактов ягод и исследований на клеточных культурах, по мнению оппонента наиболее важные результаты, подтверждающие фармакологические эффекты потребления полифенольных экстрактов ягод, получены *in vivo* при использовании разработанной Е.А. Беловой модификации патофизиологической модели метаболического синдрома у овариэктомированных крыс самок Вистар, получавших специальную углеводно-жировую диету (глава 5, стр. 88-119). Через 8 недель моделирования метаболического синдрома у овариэктомированных крыс были получены доказательства его формирования (таблицы 17-20). Изменения маркеров липидного обмена, общетоксического ответа, маркеров ожирения (таблицы 21-23), уровня глюкозы, выраженности гипертензивного синдрома были зафиксированы при двухнедельном потреблении (внутрижелудочное введение) экстрактов крысами с метаболическим синдромом. Основные результаты этого раздела исследований обобщены в диссертации в выводе № 4, констатирующем статистически значимое повышение уровня ЛВП и снижение атерогенного индекса при введении каждого из экстрактов. Потребление экстракта черники снижало содержание липопротеинов низкой плотности, аланиаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, уровень глюкозы. Экстракты ягод в различной степени влияли на выраженность гипертензивного синдрома, гепатоза, дистрофию поджелудочной железы. Для оценки остеопротекторных свойств у животных

всех групп была изучена плотность костной ткани через 3 месяца от момента проведения процедуры овариэктомии и проведен морфологический анализ костной ткани животных, которым вводили экстракт ягод черники (рис.24-32, табл.25) Установлено остеопротективное действие экстракта. Многочисленные результаты, полученные при проведении морфологического анализа жировой ткани, ткани сердца, печени, почек, поджелудочной железы у крыс с МС представлены на рисунках 33-66 и дана оценка влияния на морфологические изменения у этих животных приема изучаемых экстрактов. Совокупность полученных в этом разделе результатов исследований позволили Е.А. Беловой обоснованно рекомендовать использовать экстракты протестированных ягод в составах биологически активных добавок к пище, предназначенных для снижения риска развития «возраст-ассоциированной патологии и метаболического синдрома».

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Полученные в диссертации результаты, их достоверность и проведенное обсуждение, анализ многочисленных научных зарубежных и отечественных публикаций по тематике диссертационной работы, а также выводы и практические рекомендации позволяют заключить, что в целом, рассматриваемая диссертация является завершенным исследованием, отличающимся новизной, имеющим научную и практическую значимость. Результаты диссертации достоверны, а выводы научно обоснованы.

Полнота изложения результатов диссертации в опубликованных работах. Результаты диссертационного исследования достаточно полно отражены научными публикациями в виде 17 работ, из них 5 статей в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» ВАК РФ для изложения результатов докторских и кандидатских диссертаций и 1 монографии. Автореферат диссертации полностью передает её содержание.

Замечания. Замечания по диссертации не влияют на её выводы и положения и носят в основном технический характер. 1. Имеются неудачные выражения: например, причинная роль, модельный организм, апробация на широком спектре возраст-ассоциированной патологии, биологически активная пищевая добавка, в результате считали, в части случаев (и некоторые другие). 2. Имеют место почти дословные повторы текста (стр. 59-60, 70-71, 76) некоторые хроматограммы трудно разобрать (рис 16,17,18). Все отмеченные замечания переданы диссертанту. 3. На стр.132 высказывается предположение о том, что для исследованных экстрактов, определяющих их разносторонние эффекты (при моделировании МС) ключевыми являются антиоксидантные и антирадикальные эффекты их полифенольных компонентов, воздействующие на регуляцию путей метаболизма PI3K/PTEN/Akt/mTORCI/GSK-3. По мнению официального оппонента следует более конкретно охарактеризовать возможный механизм регуляции указанного метаболического пути.

Заключение о соответствии диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней. На основании вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа Екатерины Андреевны Беловой «Полифенольные экстракты плодов северных ягод рода *Vaccinium* как корректоры патофизиологических процессов при экспериментальном метаболическом синдроме», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Людмилы Васильевны Коваленко и кандидата медицинских наук, доцента Кривых Елены Алексеевны, является законченной научно-квалификационной работой, в которой представлены результаты фундаментально-прикладных исследований, имеющих значение для развития патофизиологии, биохимии, нутрициологии. Диссертация соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Екатерина Андреевна Белова, заслуживает

присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности
3.3.3. Патологическая физиология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федеральный исследовательский
центр питания, биотехнологии и безопасности пищи
05.09.2022

Мазо

Мазо Владимир Кимович

Сведения об официальном оппоненте:

Фамилия Имя Отчество: Мазо Владимир Кимович

Ученая степень, звание: доктор биологических наук, профессор

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и
безопасности пищи

Должность: ведущий научный сотрудник

Адрес: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14

Электронный адрес: mazo@ion.ru

Телефон: +7(495)698-53-71



Подпись руки Мазо В. К.
ЗАВЕРЯЮ: ученый секретарь Сергеев В. Ю.
05.09.2022 г.