

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Зарипова Павла Ильдаровича
«Механизмы редокс-регуляции при адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям»,
представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных

Актуальность темы и степень её разработанности.

Редокс-регуляция – это окислительно-восстановительная регуляция, фундаментальный механизм управления клеточными процессами (рост, апоптоз, метаболизм) через изменения баланса между окислителями (активные формы кислорода) и антиоксидантами. Это сигнальная система, контролирующая активность белков и экспрессию генов, часто связанная с адаптацией к стрессу. Механизм редокс-регуляции заключается в изменении структуры белков за счет окисления или восстановления их функциональных групп, что меняет их активность.

Диссертация Зарипова П.И. посвящена механизмам редокс-регуляции при адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям как самых многочисленных клеток в организме человека, обеспечивающих снабжение всех органов и тканей кислородом (O_2). Нарушение функциональной активности или снижение числа эритроцитов (анемия) приводят к ухудшению качества жизни, потере работоспособности, развитию вторичных заболеваний и преждевременной смерти. Для создания новых эффективных подходов лечения различного рода анемий необходимо исследовать механизмы повреждения и старения эритроцитов. Цель исследования заключалась в определении механизмов изменения редокс-статуса и взаимодействия гемоглобина с глутатионом при адаптации эритроцитов к характерным стрессовым воздействиям – гипоксии, метаболическому, механическому и осмотическому стрессам, действию бета-амилоидов.

Работа выполнена на высоком профессиональном уровне, демонстрирует глубокое знание предмета и владение современными методами радиобиологии и молекулярно-клеточной биологии.

Новизна и оригинальность результатов. Впервые параметры клеточного редокс-статуса, такие как АФК (активные формы кислорода), NO и уровень трипептид глутатиона (GSH) сопоставлены со степенью мажорного белка гемоглобина Hb, обеспечивающего транспорт кислорода O_2 , при связывании бета - амилоида ($A\beta_{42}$) и его изомеризованной формы (изо $A\beta_{42}$), в условиях гипоксии, при метаболическом, осмотическом и механическом стрессах. Определено влияние редокс-статуса на морфологию и ионный транспорт эритроцитов при стрессах. Установлено, что глутатионилирование Hb может происходить не только при развитии окислительного стресса, но и вследствие нарушения синтеза и восстановления GSH при снижении уровня глюкозы в крови. Показан рост глутатионилирования Hb при остром осмотическом стрессе, и его последующее снижение

при длительном воздействии. Выявлена функция Hb как депо GSH. Описан механизм роста уровня GSH в эритроцитах при гипоксии, обусловленный конформационным переходом Hb из оксигенированной в деоксигенированную форму.

Обнаруженный эффект имеет важное значение в защите эритроцитов от окислительного стресса в гипоксических тканях. Результаты работы позволяют рассматривать $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ в качестве регуляторов функциональной активности эритроцитов.

Методология и качество исполнения

В работе применяли современные биофизические, биохимические и биоинформатические методы исследования. *Образцы эритроцитов* получали из цельной крови здоровых доноров в возрасте 18-50 лет. Эритроциты отмывали и ресуспендировали в буфере, имитирующем плазму крови.

Моделирование стрессовых воздействий. Деоксигенацию проводили в гипоксической станции при 1% O_2 , 5% CO_2 , 94% N_2 в течение 3 ч. Метаболический стресс моделировали, инкубируя эритроциты в безглюкозной среде в течение 24 ч. Осмотический стресс инициировали, снижая осмолярность среды с 330 до 250 мОсм/л на 1 мин или 24 ч. Механический стресс был вызван прохождением эритроцитов через фильтр с диаметром пор 1,2 мкм при центрифугировании с ускорением 400 или 1500g. $A\beta_{42}$ или $isoA\beta_{42}$ инкубировали с эритроцитами в концентрации 0,1 или 1 мкМ в течение 90 мин. *Визуализацию морфологических изменений* проводили при помощи автоматического клеточного анализатора JuLI Stage.

Методом проточной цитофлуориметрии оценивали изменение морфологии эритроцитов по параметрам малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; уровень связанных бета-амилоидов при помощи специфических антител к $A\beta_{42}$; состояние гликокаликса по связыванию лектина; а также внутриклеточные уровни АФК, восстановленных тиолов, NO и Ca^{2+} при помощи флуоресцентных красителей DHR-123, mBBr, DAF-FM и Fluo-4, соответственно. *Уровень GSH* в эритроцитах определяли при помощи реактива Элмана и методом ядерного магнитного резонанса совместно с к.ф.-м.н. Я.В. Ткачевым. *Методом атомно-абсорбционной спектроскопии* измеряли внутриклеточные концентрации Na^+ и K^+ . *Методом иммуноблоттинга* оценивали глутатионилирование Hb. Белки разделяли по методу Лэммли и проводили электроперенос на поливинилиденфторидную мембрану, блокировали в 5% р-ре обезжиренного молока, после чего обрабатывали антителами. Визуализацию комплексов антиген-антитело проводили с помощью хемилюминесценции. *Изотермическую калориметрию титрования* использовали для определения параметров связывания окси и

деоксиформы Hb с GSH. Статистический анализ. Нормальность распределения данных определяли по критериям Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий между двумя группами оценивали парным *t*-критерием Стьюдента и *W*-критерием Уилкоксона для зависимых выборок. Достоверности различий между тремя и более группами определяли однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) для зависимых выборок с тестом Тьюки и критерием Фридмана с тестом Данна. Достоверность различий между тремя независимыми группами оценивали с помощью ANOVA и теста Тамхейна T2.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы развивают современные представления о роли редокс-статуса эритроцитов в механизмах их адаптации к различным стрессовым условиям. Показан вклад глутатионилирования Hb и образования нековалентного комплекса с GSH в адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям. Выявлена функция Hb как депо GSH. Описан механизм роста уровня GSH в эритроцитах при гипоксии, обусловленный конформационным переходом Hb из оксигенированной в деоксигенированную форму. Обнаруженный эффект имеет важное значение в защите эритроцитов от окислительного стресса в гипоксических тканях. Полученные данные могут быть использованы в разработке новых подходов для увеличения продолжительности жизни эритроцитов, необходимых для эффективной борьбы с такими патологиями, как серповидно-клеточная анемия и болезнь Альцгеймера.

Степень достоверности и апробация результатов. Выводы диссертационной работы обоснованы, прямо вытекают из результатов, полученных с использованием современных экспериментальных методик, достаточных объёмов выборок и подходящих методов статистического анализа. Выводы содержат решения поставленных задач. Апробация работы проведена на заседании кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Результаты работы представлены в устных докладах на международных научных конференциях.

Суммируя полученные результаты, отметим, что каждое исследованное стрессовое воздействие приводит к изменению редокс-статуса клеток. Система адаптации эритроцитов строится вокруг этих изменений и особую роль в ней имеют ковалентное и нековалентное взаимодействия Hb с глутатионом. Эти взаимодействия обеспечивают антиоксидантную защиту в случае развития окислительного стресса, и модулирует функциональную активность эритроцита. Полученные данные могут быть использованы в разработке новых подходов для повышения жизнеспособности эритроцитов при патологических состояниях и увеличения сроков хранения донорской крови.

Заключение

Диссертация Зарипова Павла Ильдаровича «Механизмы редокс-регуляции при адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям», заслуживает высокой оценки за глубину проработанности темы, высокое качество выполненных исследований и научный вклад в область радиобиологии. Она является важным этапом в развитии современной науки и имеет широкие перспективы для дальнейших исследований и практических приложений.

Представленная работа Зарипова П.И. «Механизмы редокс-регуляции при адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям» соответствует требованиям пункта 2.1-2.5 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 Биофизика, 1.5.5 Физиология человека и животных.

Отзыв составлен доктором биологических наук, профессором, научным консультантом Отделения радиотерапии НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес:

115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗРФ, отделение радиотерапии

Тел.: +7 (499) 444-24-24 . e-mail: ronc@info.ru; сайт: ronc.ru

«29 » мая 2026 г.

И. М. Лебеденко

Подпись И.М. Лебеденко удостоверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.м.н.

«29 » мая 2026 г.

И.Ю. Кубасова