

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Зарипова Павла Ильдаровича на тему: «Механизмы редокс-регуляции при адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям» по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки).

Актуальность темы. Эритроциты выполняют важнейшую физиологическую функцию в организме человека и животных, транспортируя кислород к тканям и забирая углекислый газ обратно в легкие. Переносчиком кислорода является эритроцитарный тетрамерный белок гемоглобин, сродство которого к кислороду регулируется посредством различных модификаций субъединиц гемоглобина. Связывание первой молекулы кислорода в легких за счет конформационных перестроек глобиновых субъединиц облегчает связывание последующих трех молекул O_2 , а закисление крови при накоплении CO_2 в результате тканевого дыхания снижает сродство гемоглобина к O_2 , и кислород более эффективно переходит в ткани (эффект Вериги-Бора). Дополнительно, процесс диссоциации кислорода стимулируется промежуточным продуктом гликолиза в эритроцитах 2,3-бисфосфоглицератом, который стабилизирует т.н. Т-форму гемоглобина, имеющую низкое сродство к кислороду. Функционально то же самое делает и связывание CO_2 с гемоглобином, хотя молекулярный механизм стабилизации отличается. Эти механизмы хорошо изучены и давно вошли в учебники. В то же время накапливающиеся научные данные свидетельствуют о том, что эти механизмы лишь частично описывают закономерности газотранспортной функции эритроцитов, которая реализуется в условиях различных физиологических и патологических стрессов, сопровождающих жизнь эритроцитов в организме. Очевидно, что концентрируя в себе сильный окислитель биомолекул, эти клетки имеют и повышенный риск окислительных повреждений, несмотря на развитую систему антиоксидантной защиты. Однако экспериментально регуляция редокс-статуса эритроцитов в условиях стресса и в связи с их газотранспортной

функцией исследована мало. На решение этих крайне актуальных вопросов и направлена диссертационная работа П.И. Зарипова.

Задачи и методы исследования. В задачи исследования входили:

1. Исследования на эритроцитах периферической крови человека, которые подвергались различным воздействиям *in vitro*, моделирующим релевантный *in vivo* стресс для этих клеток – гипоксический, метаболический (низкая концентрация глюкозы), гипоосмотический, механический (прохождение через узкие отверстия), токсический (прямое воздействие бета-амилоидных пептидов, для которых эритроциты являются одними из переносчиков в крови). В этих исследованиях оценивали редокс-статус эритроцитов (содержание АФК, NO, тиолов и прицельно глутатиона, как основного низкомолекулярного компонента антиоксидантной защиты клеток; содержание ионов Ca^{2+} , Na^+ , K^+).

2. Спектральные исследования очищенного оксигемоглобина для выявления изменений в структуре белка в присутствии глутатиона.

Для решения поставленных задач автор применил современные и адекватные методы исследования: инкубацию клеток в средах с контролируемым газовым составом, со спектрофотометрическим подтверждением степени насыщения гемоглобина кислородом, проточную цитофлуориметрию для измерения содержания Ca^{2+} , тиолов, АФК, NO с помощью флуоресцентных зондов. Уровень глутатиона оценивали биохимически и с помощью ЯМР-спектроскопии; содержание Na^+ и K^+ в эритроцитах - методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Глутатионилирование гемоглобина оценивали методом иммуноблотинга со специфическими антителами. Оптические исследования структурных свойств очищенного гемоглобина в присутствии глутатиона выполняли методами спектроскопии комбинационного рассеяния и ИК-спектроскопии. Термодинамические параметры взаимодействия гемоглобина и глутатиона определяли методом изотермической калориметрии титрования. По каждому

разделу выполнялось от 3 до 20 независимых экспериментов в повторах. Полученные количественные данные подвергались полноценной статистической обработке с определением нормальности их распределения, проведением множественных сравнений и использованием адекватных статистических тестов. Достоверность полученных в исследовании результатов не вызывает сомнений.

Научная новизна. В работе впервые показано, что гемоглобин может служить внутриклеточным депо восстановленного глутатиона (GSH) и высвобождать его в условиях низкого содержания кислорода. Измерены характеристики нековалентного взаимодействия гемоглобина и GSH. Впервые показано, что взаимодействие гемоглобина с глутатионом и изменение редокс-условий в эритроцитах важно для их адаптации к физиологически релевантным стрессовым воздействиям. Продемонстрировано влияние патологических бета-амилоидных пептидов на содержание АФК и GSH в эритроцитах, на глутатионилирование гемоглобина.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы важны для развития представлений о роли молекулярных редокс-механизмов в адаптации эритроцитов человека к физиологическим и патологическим стрессам. Обнаруженный эффект и механизм повышения уровня GSH в эритроцитах при гипоксии, обусловленный конформационным переходом гемоглобина из окси-формы в деокси-форму, представляется важным для защиты эритроцитов от окислительного стресса при тканевой гипоксии. Показано, что понижение метаболического статуса эритроцитов при недостатке глюкозы увеличивает степень глутатионилирования гемоглобина и, как следствие, его сродство к кислороду, что может иметь важное значение для патофизиологии. Наконец, результаты работы позволяют рассматривать патологические бета-амилоиды $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ с точки зрения их регуляторной активности в отношении эритроцитов, которые являются их переносчиками в кровеносной системе.

Замечания и вопросы. Диссертационное исследование П.И. Зарипова в

целом выполнено убедительно и его результаты, несомненно, вносят вклад в развитие редокс-биологии. Одновременно оно вызывает ряд вопросов и комментариев по существу.

1. Методы. с. 44. раствор, имитирующий плазму крови, не содержит альбумина. Насколько это критично для эритроцитов? И содержит 10мМ глюкозы при норме в крови 5 мМ. По клинической шкале это гипергликемия. Можно ли считать 10 мМ глюкозы контролем? Насколько релевантно моделирование полного отсутствия глюкозы (0 мМ), которое встречается только в зоне полной ишемии?

2. Методы. с. 47. Что моделирует пропускание эритроцитов через фильтр с размером пор 1.2 мкм? Капилляры имеют диаметр 5 и более мкм.

3. Результаты. с.101. Бета-амилоидные пептиды хорошо связываются максимум с 4% эритроцитов. Это может иметь физиологическое значение, или это поврежденная при выделении популяция клеток?

4. с. 102. «...изменение уровня амилазы в крови будет влиять на эффективность сорбции бета-амилоида эритроцитами». При чем здесь амилаза?

5. Рис. 42 б и д. На графиках различий не видно, но они указаны *. Они очень малы? Количество связанного амилоида различается в 5 раз при 0.1 мкМ и 1 мкМ Аβ, а параметр SSC фактически одинаков. Видна ли вытянутость эритроцитов под микроскопом? Стоило бы показать микрофотографии этих клеток.

6. Рис. 43 а, б. Не видно дозовой зависимости АФК от амилоида, которой в 5 раз выше на эритроцитах при 1 мкМ Аβ. Это связано с малым числом эритроцитов, которые так отвечают (п. 4)?

7. Рис. 43 г. На фоне DPI в контроле 1 мкМ амилоида также снижает АФК. Какой предполагается механизм в этом случае?

8. Рис.49. Почему альфа-субъединица гемоглобина при электрофорезе идет двумя полосами?

Структура и объём диссертации. Диссертация написана по стандартному плану и включает в себя Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитированной литературы (312 источников). Материал изложен на 150 страницах, содержит 2 таблицы и 55 рисунков. Обзор литературы хорошо иллюстрирован, сфокусирован и успешно выполняет функцию ознакомления читателя с молекулярной физиологией и редокс-биологией эритроцитов. Раздел Материалы и методы достаточно подробно описывает методические приемы и подходы, использованные в работе. Раздел Результаты и обсуждение самый крупный, он разделен по смысловым главам, соответствующим исследованиям определенных стресс-воздействий на эритроциты и обсуждению полученных результатов. Этот раздел завершается спектроскопическими исследованиями гемоглобина в присутствии глутатиона. Рисунки в этом разделе ясно и четко представляют полученные данные и удобно скомпонованы для восприятия. Лишь к малому их числу есть замечания. Так на рис. 43 а, б опечатка – Контоль вместо контроль. На рис. 46 а и 47 а, стрелка, указывающая на альфа-субъединицу, указывает на пустое место.

В тексте диссертации встречается небольшое число опечаток (сс. 20, 36, 40, 48, 95, 104, 105) и неудачные выражения, например, сатурации крови в мышцах, развитие заболевания в мышцах, по-русски - у мышей; микрокапилляры, вместо микрососуды. Деформабельность эритроцитов это типичный англицизм, есть термин деформируемость. В списке цитируемой литературы в английских ссылках регулярно встречаются русские вставки – и др., под. ред.

Заключение. Высказанные замечания не имеют принципиального значения и не снижают значимости диссертационного исследования П.И.

Зарипова. Результаты его работы были доложены на российских научных конференциях с международным участием и опубликованы в 4 статьях в ведущих российских и международных научных журналах, в том числе, в Redox Biology и International Journal of Molecular Sciences. Выводы по работе соответствуют полученным результатам, автореферат отражает содержание диссертации.

Диссертация П.И. Зарипова, несомненно, является оригинальным научным исследованием, выполненным лично автором. В результате проведенных исследований П.И. Зариповым получены новые данные фундаментального характера о механизмах редокс-регуляции физиологических процессов, реализующихся в эритроцитах при их адаптации к стрессовым воздействиям различной природы. Полученные автором результаты имеют также и прикладное значение в плане углубления понимания патогенеза распространенных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, диабет, ряд заболеваний крови и др.

По актуальности, научной и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Соискатель Зарипов Павел Ильдарович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник,
руководитель лаборатории клеточной подвижности Института
экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Ширинский Владимир Павлович

10.06.2026

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 414-7246
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.00.06 – Кардиология; 03.00.04 - Биохимия

Адрес места работы:

121552 г. Москва, ул. Академика Чазова, д.15а.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н.
Смирнова, лаборатория клеточной подвижности.

Тел.: 8(495)414-7246; e-mail: VPShirinskiy@cardio.ru

Подпись д.б.н., проф. В.П. Ширинский

Ученый секретарь ИЭК им. ак. И.И. Чазова

НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России

доктор медицинских наук

О.С. Плеханова

10.06.2026