

ОТЗЫВ

официального оппонента д.ф.-м.н., профессора Власовой Ольги Леонардовны
о диссертационной работе Грачева Дмитрия Ивановича на тему
«Взаимодействие нитрозильных комплексов гемового и негемового железа с
активными формами кислорода и азота»,

представленной на соискание ученой степени кандидата физико-
математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Основная часть диссертации Д.И. Грачева посвящена исследованию механизмов взаимодействия динитрозильных комплексов железа, в том числе связанных с гемоглобином, и нитрозилированных по гемовому железу гемопротеинов с активными формами кислорода, азота и галогенов, а также редокс-реакций с участием гемоглобина.

В работе проводится экспериментальное изучение физико-химических механизмов функционирования живых систем на клеточном и молекулярном уровне, а именно: исследуются механизмы взаимодействия динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), включая их ассоциацию с гемоглобином, и нитрозилированных гемопротеинов с активными формами кислорода, азота и галогенов. Особое внимание уделено их редокс-реакциям, в которых участвует гемоглобин. Тематика работы имеет важное значение для развития биофизики процессов, связанных со свободными радикалами, а также для создания новых методов диагностики и лечения заболеваний, вызванных их воздействием. Т.о., результаты исследований Д.И. Грачева обладают значительной практической ценностью.

Основной акцент в диссертации сделан на исследовании свойств ДНКЖ и их взаимодействий с модельными системами, содержащими гемопротеины и прооксидантные соединения. Также изучались физико-химические свойства мембран эритроцитов при окислительном стрессе и связанных с ним патологиях, что подтверждает актуальность исследования.

Работа обладает значительной научной новизной. С помощью метода спиновых меток впервые было обнаружено различие в микровязкости мембран эритроцитов у пациентов с различными уровнями показателя анизотропии эритроцитов, а также при добавлении гипохлорита в сравнении с интактными эритроцитами. Методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) впервые было показано разрушение ДНКЖ в условиях гипохлорит-индуцированного гемолиза. Кроме того, на модельных системах выявлены антиоксидантные и антирадикальные свойства ДНКЖ, а также защитный эффект нитрозилирования гемового железа гемоглобина.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Общий объем составляет 142 страницы, включая 39 рисунков, 4 таблицы и 240 источников. Во введении обоснована актуальность исследования, сформулированы цели и задачи, изложены новизна, практическая и теоретическая значимость, методы и положения, выносимые на защиту, а также представлены данные об апробации и публикациях.

Глава 1 представляет обзор литературы. В ней рассматриваются метаболизм оксида азота (NO), его функции и производные, а также роль в окислительном и нитрозативном стрессах. Также описаны свойства гемопротеинов и стабилизированные формы NO, такие как ДНКЖ.

Глава 2 детализирует материалы и методы исследования. Эксперименты проводились на эритроцитах, модельных системах с гемопротеинами, липопротеинах низкой плотности и липосомах. Основным методом исследования была спектроскопия ЭПР, также применялись методы хемилюминесценции и спектрофотометрии.

Глава 3 содержит оригинальные результаты исследования. Она разделена на восемь частей.

Раздел 3.1 посвящен изучению микровязкости мембран эритроцитов в интактных образцах, с нормальным и повышенным показателями анизотропии эритроцитов, а также при добавлении к образцам гипохлорита натрия. В работе выявлено достоверное различие микровязкости мембран эритроцитов между указанными группами.

Эксперименты в разделе 3.2 исследуют влияние ДНКЖ при гипохлорит-индуцированном гемолизе. В этом разделе диссертации демонстрируется, что защитное действие ДНКЖ при гемолизе сопровождается их разрушением.

Раздел 3.3 содержит оценку антиоксидантных свойств ДНКЖ на модельных системах, содержащих ДНКЖ с различными лигандами, гемопротеины, а также прооксидантные соединения, такие как пероксинитрит. Экспериментально показано, что ДНКЖ, действительно, оказывает антиоксидантное действие в данных системах.

В разделе 3.4 автор рассматривает влияние гемовых комплексов NO и ДНКЖ в системах с органическими гидропероксидами. Антирадикальный эффект как гемовых, так и негемовых комплексов NO определен с помощью спектроскопии ЭПР аддуктов органических радикалов со спиновой ловушкой DEPMPO.

Раздел 3.5 посвящен изучению антиоксидантного действия ДНКЖ в условиях перекисного окисления липидов. С использованием различных экспериментальных методов получены количественные характеристики

подобного действия глутатион-содержащих ДНКЖ, в том числе в сравнении с другими антиоксидантами.

Раздел 3.6 диссертации представляет собой исследование процессов восстановительного нитрозилирования гемопротеинов. В качестве донора нитроксила – физиологически важного метаболита оксида азота использована соль Анджели. Впервые показано восстановительное нитрозилирование оксоферрильных форм гемоглобина и миоглобина.

В раздел 3.7 автор выносит обсуждение и обобщение полученных данных, их сравнение с литературой. Следует отметить проведенную автором работу по систематизации доступных материалов по тематике диссертационной работы.

Раздел 3.8 содержит описание предполагаемых автором механизмов антиоксидантного действия нитрозильных комплексов на основе полученных им экспериментальных данных и сведений из актуальных научных статей.

В разделе «Заключение» автор диссертации подводит итоги работы и делает выводы. Также приведены публикации автора и список литературы.

Основными достоинствами диссертации автора можно считать:

1. тщательно проведенный обзор научной литературы, в котором уделено внимание как общим сведениям об активных формах кислорода, оксиде азота и его активных метаболитах, гемопротеинах, так и самым актуальным данным, относящимся непосредственно к тематике работы - взаимодействию прооксидантных соединений с комплексами гемового и негемового железа;
2. грамотное применение и описание в тексте диссертации экспериментальных методов, прежде всего спектроскопии ЭПР, являющейся «золотым стандартом» в изучении различных комплексов железа с оксидом азота, а также свободнорадикальных процессов
3. высокое качество обработки и анализа экспериментальных данных, обоснованное применение статистических критериев;
4. глубокое обсуждение результатов с их сопоставлением с данными, представленными в литературе.

Вместе с тем, к работе имеются некоторые замечания:

1. Автор диссертации излишне кратко пояснил теоретическую значимость работы.
2. В диссертации основной упор сделан на исследования с применением метода электронного парамагнитного резонанса. Использование дополнительных методов исследования и теоретических расчетов позволило бы получить более полную картину взаимодействия

нитрозильных комплексов гемового и негемового железа с прооксидантными соединениями.

3. Не очень понятно, что автор имеет в виду, употребляя в подписи оси ординат на стр. 89 (рис.30 а) – “хемилюминесценция, отн.ед.” Хемилюминесценция – это некое явление (свечение), в каких относительных единицах оно измеряется? Возможно, автор имел в виду интенсивность хемилюминесценции в у.е. (внесистемных) единицах?
4. Часть выводов работы носит качественный характер, без количественной оценки, что снижает их аналитическую ценность, например, в пункте 2 “Основных результатов и выводов” не указано, насколько снижается концентрация динитрозильных комплексов железа.

Указанные выше недостатки не оказывают существенного влияния на общее положительное впечатление о работе. Результаты, представленные в диссертации, вносят значимый вклад как в развитие фундаментальной биофизики, так и в ее прикладные аспекты, включая медицинские приложения. Основные результаты диссертации, опубликованы в рецензируемых научных журналах и докладывались на российских и международных научных конференциях.

Таким образом, следует заключить, что представленная диссертация «Взаимодействие нитрозильных комплексов гемового и негемового железа с активными формами кислорода и азота» является законченным научным исследованием. Считаю, что диссертация «Взаимодействие нитрозильных комплексов гемового и негемового железа с активными формами кислорода и азота» соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика» (по физико-математическим наукам), а также критериям, определённым пп. 2.1–2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», предъявляемым к кандидатским диссертациям, и оформлена согласно приложениям № 8 и 9 «Положения о совете по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова», а её автор — Грачев Дмитрий Иванович – заслуживает присуждения учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

Официальный оппонент: доктор физико-математических наук, профессор, директор Высшей школы биомедицинских систем и технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Власова Ольга Леонардовна

195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29. Телефон: +7 (812) 290-95-00 E-mail: vlasova.ol@spbstu.ru,

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 03.01.02 – «Биофизика» (по физико-математическим наукам)

Подпись директора ВШБСиТ О.Л. Власовой заверяю: _____