

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора физико-математических наук Проскурякова Ивана Игоревича 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.

Диссертационная работа Грачева Д.И. посвящена выяснению механизмов взаимодействия динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и нитрозильных комплексов гемового железа с активными формами кислорода и азота, образующимися в организме человека, а также с органическими свободными радикалами. Оксид азота (NO) - важнейшая регуляторная и сигнальная молекула в биологических системах. Ее свойства во многом зависят от взаимодействия с гемовым и негемовым железом. В результате такого взаимодействия образуются различные нитрозильные комплексы железа, обладающие собственной биологической активностью. В частности, они могут участвовать в окислительно-восстановительных реакциях с активными формами кислорода, азота и галогенов. Предполагается, что эти реакции играют важную роль в поддержании баланса прооксидантных и антиоксидантных процессов в организме. В связи с этим полученные диссертантом данные, подтверждающие антиоксидантные свойства ДНКЖ и доноров нитроксила (HNO), представляют существенное практическое значение для биофизической медицины, а также разработки новых подходов в профилактике и лечении ряда социально-значимых заболеваний. Часть диссертационного исследования относится к изучению физико-химических характеристик мембран эритроцитов в условиях, моделирующих окислительный стресс. Таким образом, тематика представленной диссертации имеет важное значение для биофизики свободно-радикальных процессов в живых системах и является несомненно **актуальной и современной**.

Научная новизна диссертационной работы также не вызывает сомнений. В ходе проведенных исследований был получен ряд приоритетных результатов. Так, автором диссертации с помощью метода спиновых зондов (в диссертации "спиновых меток", см. замечание ниже) выявлено достоверное различие микровязкости мембран эритроцитов у групп пациентов с нормальным и повышенным коэффициентом анизотропии эритроцитов, а также в группе образцов с добавлением гипохлорита, в сравнении с контрольной группой. С использованием метода спектроскопии электронного парамагнитного резонанса были впервые изучены процессы образования и разрушения динитрозильных комплексов железа и нитрозильных комплексов гема в ходе индуцированного гипохлоритом гемолиза эритроцитов. В различных экспериментальных системах, моделирующих окислительный стресс и свободно-радикальное окисление биомолекул, показано антирадикальное и антиоксидантное действие ДНКЖ. Кроме того, впервые продемонстрирован антиоксидантный эффект нитроксила в системах, содержащих гемопротеины и различные гидропероксиды.

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации составляет 144 страницы, включая 39 рисунков, 4 таблицы, 240 библиографических ссылок.

Во Введении обосновывается актуальность темы исследования, ставятся цели и задачи диссертации, определяются предмет и объект исследования, обосновываются научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, излагается методология исследования, формулируются положения, выносимые на защиту, обосновывается достоверность результатов, представляются данные об апробации работы и о публикациях результатов, вошедших в диссертацию.

Глава 1 представляет собой обзор литературы. В ней излагаются основные сведения о метаболизме NO, описаны важнейшие метаболиты

этого соединения, пути их синтеза и функции в организме, а также про- и антиоксидантные свойства самого NO и его физиологических производных. Среди них особое внимание уделено динитрозильным комплексам железа с тиол-содержащими лигандами. Отражены современные представления об окислительном и нитрозативном стрессе, роли активных форм кислорода (АФК) и метаболитов NO в этих процессах. Кроме того, рассмотрены функции и физико-химические свойства гемопротеинов, в первую очередь их участие в свободнорадикальном окислении, а также данные о физиологической роли нитрозильных комплексов с гемовым железом.

Глава 2 посвящена описанию материалов и методов исследования. В работе применялись современные биофизические методы, адекватные поставленным задачам диссертации. Основным экспериментальным методом являлась спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В ряде экспериментов использовались методы хемилюминесценции и спектрофотометрии.

В Главе 3 автор излагает результаты исследования. Данная глава состоит из восьми разделов.

В разделе 3.1 приведены результаты изучения методом ЭПР спин-зондов микровязкости мембран эритроцитов в норме и при отклонениях некоторых клинически значимых показателей крови, ассоциированных с окислительным стрессом. Кроме того, получены данные об изменении микровязкости мембран эритроцитов под воздействием гипохлорита (добавкой HClO) для моделирования состояния интенсивного окислительного стресса эритроцитов.

Раздел 3.2 содержит данные о разрушении ДНКЖ и нитрозильных комплексов гемового железа при гипохлорит-индуцированном гемолизе в условиях, моделирующих галогенирующий стресс. Делается вывод, что антиоксидантные свойства ДНКЖ, а также их защитное действие при индуцированном хлорноватистой кислотой гемолизе могут быть

обусловлены непосредственным взаимодействием этих комплексов с HClO , что приводит к распаду ДНКЖ.

В разделе 3.3 рассматривается антиоксидантное действие ДНКЖ в различных условиях с использованием их сигналов ЭПР. В системе, моделирующей нитрозативный стресс, исследовано действие пероксинитрита (ONOO-) на ДНКЖ, связанные с изолированным гемоглобином (Hb-ДНКЖ).

Раздел 3.4 посвящен изучению действия нитрозильных комплексов гема и ДНКЖ в системе, моделирующей перекисное окисление с участием гемопротеинов. Реакции гемопротеинов с различными биологическими гидропероксидами автор работы моделирует при помощи гидропероксида трет-бутила ($t\text{-BuOOH}$). Возникающие короткоживущие свободные радикалы идентифицировались по их аддуктам со спиновой ловушкой DEPMPO. Показано, что добавка ДНКЖ существенно уменьшает концентрацию свободнорадикальных соединений.

В разделе 3.5 рассмотрено антиоксидантное и антирадикальное действие ДНКЖ, содержащие глутатионовые лиганды, в условиях, моделирующих окислительный стресс и перекисное окисление липопротеинов низкой плотности и лецитиновых липосом, а также при ферментативной генерации супероксидного радикала.

Раздел 3.6 включает в себя экспериментальные данные исследований восстановительного нитрозилирования оксоферрильных форм миоглобина и гемоглобина под действием нитроксила (HNO), который является продуктом одноэлектронного восстановления и протонирования NO .

Раздел 3.7 содержит обсуждение и обобщение полученных в работе результатов, а также сравнение их с литературными данными. В частности, автором диссертационной работы представлена таблица показанных в данной работе и описанных в литературе эффектов взаимодействия нитрозильных комплексов гемового и негемового железа с различными прооксидантными соединениями.

В разделе 3.8 обсуждаются возможные механизмы антиоксидантного действия нитрозильных комплексов гемового и негемового железа. Представлена гипотетическая схема взаимодействия нитрозильных комплексов железа со свободными радикалами биомолекул и супероксидным радикалом.

Основная часть диссертации завершается разделом «Заключение», в котором излагаются главные результаты и выводы работы. Далее приводятся список публикаций автора по материалам диссертации и список цитированной литературы.

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых научных журналах и докладывались на российских и международных научных конференциях. Текст диссертации написан ясным языком и хорошо иллюстрирован. Автореферат и публикации достаточно полно и корректно описывают содержание диссертационной работы.

В качестве основных достоинств диссертации Дмитрия Ивановича Грачева можно выделить следующие:

Глубокий обзор литературы; рассмотрение важных с практической точки зрения вопросов в области науки, в которой выполнена данная работа; качественно выполненные, обработанные и проанализированные экспериментальные исследования; наличие подробного обсуждения результатов и сопоставления их с имеющимися литературными данными.

Несмотря на общую высокую оценку, по диссертации Грачева Д.И. имеется ряд вопросов и замечаний:

- Вызывает вопросы применение для детектирования короткоживущих радикалов разной природы одной и той же спиновой ловушки - DEPMPO. Стандартной практикой является подбор ловушек, наиболее селективно реагирующих с ожидаемыми продуктами, что позволяет более надежно устанавливать их природу. Возможно, невысокая селективность DEPMPO явилась причиной примененной в описанных экспериментах высокой концентрации ловушки. В случае детектирования анион-радикалов

супероксида, вероятно, следовало использовать спиновые ловушки на основе циклических гидроксиламинов, которые позволяют обнаружить это состояние при использовании в десятки раз меньших концентраций.

- Нигде в представленных материалах (включая публикации) не описаны методы внесения спиновых ловушек и зондов в исследуемые препараты. При этом способы внесения могут оказывать существенное влияние на изучаемые системы. Особенно важно это при работе с липидными спин-зондами, поскольку их предварительно переводят в полярные растворители, которые могут оказывать на биологические препараты существенный негативный эффект.

- Имеется два замечания по использованной терминологии: (1) термин "спиновая метка" в настоящее время закреплен за ковалентно связывающимися радикалами. Используемые в работе липидные радикалы более корректно называть "спиновый зонд"; (2) автором в ряде случаев (с. 34, с. 87, с. 98) использован термин "скоростная константа" вместо стандартного "константа скорости".

Указанные недостатки не меняют общего положительного впечатления от диссертации. Результаты и выводы, представленные в диссертации, несомненно, вносят существенный вклад в развитие как фундаментальной биофизики, так и ее медицинских приложений.

Подводя итоги, можно заключить, что диссертация Грачева Дмитрия Ивановича представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком научном уровне, и имеет как теоретическую, так и научно-практическую значимость. **Достоверность** полученных её автором результатов подтверждается тщательно проведенной статистической обработкой, а их детальный и корректный анализ позволяет говорить о высокой степени **обоснованности выводов**, сформулированных в диссертации. Нужно отметить, что выносимые на защиту положения и выводы, основываются как на собственных данных диссертанта, так и на обобщении известных достижений фундаментальных научных дисциплин, связанных с тематикой диссертации.

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). Эта работа по своей актуальности, научной новизне и практической значимости, адекватности методических подходов, объёму выполненных исследований, а также достоверности полученных результатов отвечает 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, 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, и.о. заведующего Лабораторией молекулярной спектроскопии, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН) – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,

Проскуряков Иван Игоревич

01.09.2025, Россия, Московская обл., г. Пушкино, 142290, ул. Институтская, дом 2

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 03.00.02 – «Биофизика» (по физико-математическим наукам)