

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора химических наук, профессора Горина Дмитрия Александровича 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.

Функционирование оксида азота (NO) как важнейшей регуляторной и сигнальной молекулы в биологических системах во многом зависит от его взаимодействия с гемовым и негемовым железом. В результате него образуются различные нитрозильные комплексы железа, обладающие собственной биологической активностью, в частности они могут участвовать в редокс-реакциях с активными формами кислорода, азота и галогенов. Предполагают, что эти реакции играют важную роль в поддержании баланса прооксидантных и антиоксидантных процессов в организме. Диссертационная работа Грачева Д.И. посвящена выяснению механизмов взаимодействия динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и нитрозильных комплексов гемового железа с вышеупомянутыми активными формами и органическими свободными радикалами. Вместе с тем, часть диссертационного исследования связана с изучением физико-химических характеристик мембран эритроцитов в условиях моделирующих окислительный стресс. Тематика представленной диссертации имеет важное значение для понимания биофизики свободно-радикальных процессов в живых системах и является несомненно актуальной и современной.

За последние десятилетия сохраняется тенденция к увеличению числа исследований посвященных патофизиологическим процессам ассоциированным с окислительным стрессом и нарушением функционирования оксида азота, в том числе заболеваниям сердечно-сосудистой системы. В частности считается, что взаимодействие NO со свободными радикалами может быть основной причиной возникновения толерантности к экзогенным донорам оксида азота. В связи с этим полученные диссертантом данные, подтверждающие антиоксидантные свойства ДНКЖ и доноров нитроксила (HNO) имеют существенное практическое значение для медицины, состоящее в разработке новых подходов к профилактике и лечению ряда социально-значимых заболеваний.

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений. В ходе проведенных исследований был получен ряд приоритетных результатов. Так автором диссертации с помощью метода спиновых меток 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 свободнорадикальное окисление биомолекул, показано антирадикальное и антиоксидантное действие ДНКЖ. Кроме того, впервые продемонстрирован антиоксидантный эффект нитроксила в системах содержащих гемопротеины и различные гидропероксиды.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Общий объём диссертации составляет 142 страницы, включая 39 рисунков, 4 таблицы, 240 библиографических ссылок.

Во введении показывается 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 подробному описанию материалов и методов исследования. В работе применялись современные биофизические методы адекватные поставленным задачам диссертации. Основным методом являлась спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Этим методом с использованием спиновых ловушек регистрировали образование свободных радикалов. С помощью спектроскопии ЭПР спиновых меток оценивалась микровязкость мембран эритроцитов. В ряде экспериментов использовались методы хемилюминесценции и спектрофотометрии. Были также разработаны экспериментальные системы, моделирующие окислительный, нитрозативный

и галогенирующий стрессы. Эти модельные системы содержали различные прооксиданты в сочетании с человеческими эритроцитами, гемопротеинами (гемоглобином, миоглобином, цитохромом с), а также липопротеины низкой плотности (ЛНП) и лецитиновые липосомы. Свободнорадикальное окисление липосом индуцировалось азоинициатором, а ЛНП введением в реакционную среду сульфата меди. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных автор работы проводил, используя пакет программ Origin 8 фирмы OriginLab Corporation. Достоверность отличий в работе была определена с применением критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни.

В главе 3 автор излагает оригинальные результаты диссертационного исследования. Данная глава состоит из восьми разделов, первые шесть из которых содержат экспериментальные результаты, полученные в рамках диссертационной работы, а последние два посвящены обсуждению и анализу этих результатов.

В разделе 3.1 автор изучает микровязкость мембран эритроцитов в норме и при отклонениях некоторых клинически значимых показателей крови, ассоциированных с окислительным стрессом. Кроме того, были получены данные о изменении микровязкости мембран эритроцитов под воздействием гипохлорита.

Раздел 3.2 содержит данные об образовании и разрушении ДНКЖ и нитрозильных комплексов гемового железа при гипохлорит-индуцированном гемолизе в условиях, моделирующих галогенирующий стресс.

В разделе 3.3 рассматривается антиоксидантное действие ДНКЖ в различных условиях. В системе, моделирующей нитрозативный стресс, исследовано действие пероксинитрита на ДНКЖ, связанные с гемоглобином (Нб-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.

В разделе 3.5 рассмотрено антиоксидантное и антирадикальное действие ДНКЖ содержащих глутатионовые лиганды в условиях, моделирующих окислительный стресс и перекисное окисление липидов в ЛНП и лецитиновых липосомах, 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 с 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 достаточно полно и правильно описывает содержание диссертационной работы.

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

- подробный и идеально логически построенный 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 несколько замечаний и вопросов:

1. Литературный обзор. С.25, автор пишет: "Результатом действия пероксинитрита является и опосредованный NAD⁺ выход из митохондрий катионов кальция [73]." Есть ли информация о концентрациях

высвобождаемых ионах кальция и какой процент они составляют от концентрации данных ионов в митохондрии?

2. Литературный обзор. С.49. Автор пишет: "Предположительно, в реакциях с нитрозильными комплексами гемового и негемового железа происходит *двухэлектронное* восстановление гидропероксидов [173,174]". Пропущена буква р в слове "*двухэлектронное*".

3. Глава 3. С.70. Рис.17 - низкое качество изображения - цифры на оси магнитное поле.

4. Глава 3. С. 92. Рис. 31. - можно ли оценить время жизни хемилюминесценции из полученных зависимостей? И если да, то может ли этот параметр помочь в анализе полученных экспериментальных данных?

Указанные недостатки, однако, не снижают высокую оценку диссертационной работы и носят характер пожеланий на будущее. Результаты, 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. Методы и экспериментальные подходы, применённые в диссертационном исследовании, являются адекватными и современными.

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 химических наук, профессор, профессор центра фотоники и фотонных технологий Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»,

Горин Дмитрий Александрович

15.08.2025

Территория Инновационного Центра «Сколково», Россия, Москва, 121205,
Большой бульвар д. 30, стр. 1. Тел.: +79172077630 E-mail:
D.Gorin@skoltech.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 02.00.04 – «Физическая химия» (по химическим наукам)

Подпись профессора Д.А. Горина заверяю: _