

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от «22» июня 2017 г. протокол № 8 о присуждении Насыбуллиной Эльвире Ильгизовне, гражданство РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Насыбуллиной Эльвиры Ильгизовны на тему «Действие метаболитов оксида азота и карбонильных соединений на гемоглобин», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. Биохимия, принята к защите «19» апреля 2017 г. (протокол № 6) диссертационным советом Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2. Совет утвержден Рособназдором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк и от 10.02.2014 г. № 55/нк и с учетом переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк.

Соискатель Насыбуллина Эльвира Ильгизовна, 1987 года рождения, в 2010 г. окончила Московский государственный университет пищевых производств (МГУПП) по специальности «Биотехнология». В ноябре 2010 года поступила в очную аспирантуру Учреждения Российской академии наук Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, где проходила обучение по декабрь 2013 года. С декабря 2013 года работала в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук в должности и.о. младшего научного сотрудника. В 2015 г. окончила очную магистратуру Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (НИЯУ «МИФИ») по кафедре «Компьютерные медицинские системы». С февраля 2017 года по настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Диссертационную работу Насыбуллина Э.И. выполняла в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Федерального государственного учреждения

«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель – доктор биологических наук Топунов Алексей Федорович, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота, заведующий.

Официальные оппоненты:

Панасенко Олег Михайлович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства, заведующий лабораторией физико-химических методов исследования и анализа

Тимошин Александр Анатольевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических методов исследования дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский педагогический государственный университет» (МПГУ) в своем положительном заключении, подписанном заведующей кафедрой биохимии, молекулярной биологии и генетики, доктором биологических наук, профессором Кутузовой Ниной Михайловной, указало, что по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертация Насыбуллиной Э.И. является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня, замечания носят частный характер и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям, которые установлены для кандидатских диссертаций «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, профессор Панасенко Олег Михайлович является признанным специалистом в области биохимии реакционно-активных соединений и их воздействия на структуру и функции белков, а доктор биологических наук Тимошин Александр Анатольевич известен своими работами по изучению метаболитов оксида азота, в том числе, динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации обоснован активно ведущимися исследованиями в области окислительно-восстановительных процессов, активных карбонильных и азотсодержащих соединений и их влияния на организм, в том числе, на сердечно-сосудистую систему.

Материалы диссертации отражены в опубликованных автором 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Количество публикаций и требования к изданиям удовлетворяют пункту № 11 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

Статьи:

1. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress. // *Hemoglobin*. 2013. V. 37. N 3. P. 205-218.
2. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of Nitri- and Nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. // *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*. 2014. V. 52. N 1. P. 161-168.
3. Насыбуллина Э.И., Никитаев В.Г., Проничев А.И., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Экспертная система диагностики гемоглобинопатий с использованием данных о состоянии крови, эритроцитов и гемоглобина. // *Краткие сообщения по физике*. 2015. № 7. С. 22-27.
4. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Gromov S.V., Novikov A.A., Topunov A.F. New dinitrosyl iron complexes bound with physiologically active dipeptide carnosine. // *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2016. doi:10.1007/s00775-016-1418-z

Материалы конференций:

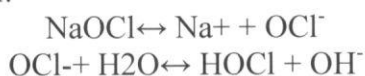
1. Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Влияние S-нитрозоглютамина на модификацию гемоглобина метилглиоксалем. // Труды XIX международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». IT + M&E'2011. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, с 31мая по 10 июня 2011 года. С. 112-113.
2. Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Переход гемоглобина из растворимого в мембранно-связанное состояние под действием нитрозотиолов и нитритов на эритроциты. // V Международная научная конференция «Химия, структура и функция биомолекул». Сборник материалов. 4-6 июня 2014 г. Минск, Белоруссия. С. 136-137.
3. Насыбуллина Э.И., Ключев К.И., Никитаев В.Г., Проничев А.Н., Дмитриева В.В., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Разработка компьютерной системы BLOOD для диагностики гемоглобинопатий. // Сборник материалов III межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемий в XXI веке» / ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. Рязань, 2015. С. 20-23.
4. Насыбуллина Э.И., Никитаев В.Г., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Компьютерные системы диагностики с использованием данных о состоянии гемоглобина и эритроцитов: пути создания. // Современные проблемы физики и технологий. IVя Международная молодежная научная школа-конференция, 17-22 марта 2015 г.: Тезисы докладов. М.: НИЯУ МИФИ, 2015. Ч. 2. С. 44-45.
5. Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Никитаев В.Г., Топунов А.Ф. Система поддержки принятия решений при выявлении гемоглобинопатий: постановка задачи. // Научная сессия НИЯУ МИФИ-2015. Аннотации докладов. М.: Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 2015. Том 2. С. 65.
6. Насыбуллина Э.И., Никитаев В.Г., Проничев А.И., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Диагностика гемоглобинопатий с помощью компьютерных медицинских систем. // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы международной конференции IT + M&Eс'2015. (Гурзуф, 02 - 12 июня 2015 г.). 2015. Весенняя сессия. С. 75-79.
7. Nasybullina E.I., Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. Formation of membrane-bound hemoglobin under influence of nitric oxide metabolites in presence of

На диссертационную работу Э.И. Насыбуллиной поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Панасенко Олега Михайловича (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

1. В ряде случаев номера рисунков не совпадают с их номерами в тексте диссертации, например, стр. 18, рис. 2 вместо рис. 3; стр. 84 рис. 20 вместо 31; стр. 101, рис. 38 вместо рис. 37; стр. 40-42, сначала ссылка на рис. 10, а потом на рис. 9.
2. В разделе 2.1. Материалы на стр. 47 в качестве использованного в работе реагента указана хлорноватистая кислота HOCl. Однако как такового индивидуального реагента HOCl не существует. HOCl существует только как результат равновесия в водном растворе соли NaOCl:



Вероятнее всего, авторы использовали коммерческий раствор NaOCl (гипохлорит натрия).

3. Необоснованным являются обозначения на осях большинства рисунков на английском языке. Например, рис. 14, 15, 17, 18 и др.
4. На рис. 14, стр. 58 (рис. 3 в автореферате) представлено ингибирование образования флуоресцирующих конечных продуктов гликирования в %. Говорится, что наиболее сильно ингибировали реакцию соль Ангели (донор нитроксильного аниона) (примерно на 70%), динитрозильные комплексы железа с фосфатными лигандами (ДНКЖ-PO₄⁻) (примерно на 68%) и соль Ангели с сульфатом железа (примерно на 85%). Однако, в подписи к рисунку указано, что за 100% принято количество флуоресцирующих конечных продуктов гликирования в контрольном варианте (без доноров NO). Если так, то столбики 4, 5 и 6 демонстрируют наилучшее ингибирование реакции, поскольку в этом случае образуется наибольшее количество конечных продуктов гликирования.
5. Судя по подписи к рис. 16, стр. 61, спектры 2 и 3 ничем не должны различаться (в обоих случаях написано: модифицированный гемоглобин (Hb) + 600 мкМ ДНКЖ-PO₄⁻) Видимо, различие все же есть. Какое?
6. В подписи к рис. 24, стр. 71 отсутствует описание кривой 3.
7. Из подписи к рис. 31, стр. 85 не понятно, что принято за 100%?
8. Какова гарантия того, что при измерении мембраносвязанного гемоглобина измеряемый Hb – это связанный с мембраной, а не остаточный в результате недостаточно полной отмывки от цитоплазматического Hb?
9. Рис. 37, стр. 99. Видно, что HOCl сам по себе при низких концентрациях снижал Hb примерно на 2% по сравнению с уровнем автогемоглиза. Является ли этот эффект достоверным? К сожалению, не указаны разбросы. Если да, то как это объяснить? Не может ли это быть обусловлено искажением результата, связанным с взаимодействием HOCl с Hb? Проводился ли контрольный эксперимент для исключения возможности такого артефакта?
10. Там же. Максимальная концентрация HOCl (400 мкМ) приводила к увеличению % Hb в растворе примерно с 3-х до 6%, то есть на 3% по сравнению с автогемоглизом. Другими словами, гемолизу подвержены только 3% клеток. Возможно, это какие-то аномальные эритроциты, например, поврежденные при приготовлении суспензии клеток?

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук Тимошина Александра Анатольевича (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

«Раздел «Обзор литературы» - достаточно подробный и содержательный, носит компилятивный характер. Тем не менее, в данном разделе автору следовало бы уделить внимание не только изложению литературных данных, но также провести их критическое обсуждение, и на этом основании более четко обосновать цель и задачи диссертационной работы.

Кроме того, в рецензируемой работе отсутствует информация о кратности повторения опытов. Далее, при изложении собственных результатов автора на некоторых рисунках не указана величина экспериментальной ошибки. Нужно также отметить, что надписи на большинстве рисунков (названия осей на графиков и т.д.) сделаны на английском языке, хотя предпочтительнее было бы привести их на русском. Кроме того, при описании структуры динитрозильных комплексов железа связанных с дипептидом карнозином автор диссертации предполагает, что железо в этих комплексах координировано с азотом имидазольного кольца гистидинового остатка карнозина. Вместе с тем, сигнал ЭПР карнозиновых ДНКЖ, представленный на рис. 17 А, имеет сверхтонкую структуру, когда на спектрах рисунка 18 сверхтонкая структура отсутствует. Считаю, что автору следовало бы привести более подробное объяснение полученного эффекта».

Отзыв Ведущей организации - Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московского педагогического государственного университета» (МПГУ) (положительный).

Отзыв содержит следующие замечания:

«При изучении влияния метаболитов NO и метилглиоксаля на гемоглобин в модельных системах были использованы достаточно высокие концентрации действующих соединений. Насколько они соответствуют физиологическим концентрациям данных веществ в организме и как полученные данные объясняют особенности идущих в организме процессов?»

Следовало бы поподробнее описать диагностике каких заболеваний может помочь включение данных о содержании мембраносвязанного гемоглобина в базу данных разрабатываемой экспертной диагностической системы.»

На автореферат поступили положительные отзывы от:

1. Баймиева Алексея Ханифовича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной биологии и нанобиотехнологии ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. Отзыв содержит замечание: «К недостаткам работы можно отнести незначительное количество опечаток в тексте автореферата диссертации»;
2. Бородулина Владимира Борисовича, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой биохимии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, замечаний нет;
3. Емельянова Виктора Владимировича, кандидата медицинских наук, доцента кафедры иммунохимии, доцента кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина». Отзыв содержит вопросы: «Известно ли из литературы об изменении содержания мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах больных сахарным диабетом? В связи с этим, учитывалось ли наличие сахарного диабета у пациентов при формировании «обучающей» выборки в ходе разработки компьютерной экспертной системы для диагностики анемий?»

4. Комбаровая Светланы Петровны, кандидата биологических наук, доцента, ведущего инженера-технолога ТО ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко», замечаний нет;
5. Луневой Оксаны Георгиевны, кандидата биологических наук, доцента кафедры биофизики Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, замечаний нет;
6. Сапожковой Жанны Юрьевны, кандидата медицинских наук, заведующей клинико-диагностической лабораторией ООО «ИНКРАЙМ», замечаний нет;
7. Смирнова Игоря Юрьевича, доктора биологических наук, профессора кафедры биологии Костромского государственного университета, замечаний нет;
8. Текуцкой Елены Евгеньевны, кандидата химических наук, доцента кафедры радиофизики и нанотехнологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», замечаний нет.

В дискуссии приняли участие:

Доктор биологических наук, профессор Шишкин Сергей Сергеевич (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Доктор технических наук, профессор, заведующий кафедры «Компьютерные медицинские системы» Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» Никитаев Валентин Григорьевич

Доктор биологических наук, профессор Крицкий Михаил Сергеевич (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

1. Физиологические метаболиты оксида азота (S-нитрозоглутатион, динитрозильные комплексы железа, нитроксильный анион, нитрит анион) ингибируют реакцию неферментативного гликирования аминокислотных остатков гемоглобина и карнозина, индуцированную метилглиоксалем.
2. Показано образование динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с продуктами модификации гемоглобина и карнозина метилглиоксалем. Формирование ДНКЖ является одним из механизмов антигликирующего действия метаболитов оксида азота.
3. Нитрозоглутатион в условиях карбонильного стресса стимулирует образование редокс-активных соединений, которые могут быть нитрозилирующими и нитрующими агентами для метгемоглобина, а также вызывать окислительную модификацию гемоглобина и его связывание с компонентами мембраны эритроцита.
4. Разработана спектрофотометрическая методика оценки доли мембраносвязанного гемоглобина (МВНб) в эритроцитах, позволяющая обнаруживать менее 0,1% МВНб в образце. Установлен диапазон нормальных значений для МВНб: 3,3-4,9%.
5. Среди обследованных онкологических больных, которым была назначена химиотерапия, несоответствие норме уровня МВНб наблюдалось у 61%, в то время как в контрольной группе эта величина составляла 36%. Среди пациентов с диагностированной анемией данный показатель составлял 74%, в контрольной группе – 35%.
6. Разработана пилотная версия компьютерной экспертной системы для диагностики анемий у онкобольных, учитывающая данные о содержании мембраносвязанного гемоглобина.

Практическая и теоретическая значимость диссертации и использование полученных результатов.

В настоящее время рассматривается возможность использования показателя реактивности эритроцитов в качестве индикатора стрессового состояния ил адаптационной реакции организма. Мы предлагаем производить оценку реактивности эритроцитов по содержанию МВНб. Уровень МВНб в крови также можно использовать в клинической диагностике в качестве дополнительного биохимического показателя

выраженности интоксикационного синдрома. Разработанная в рамках данной работы методика спектрофотометрической оценки доли МВНб в эритроцитах может быть полезна для этих целей. Предложенная пилотная версия компьютерной экспертной системы, учитывающая данные о МВНб, может послужить основой для создания диагностического комплекса, направленного на повышение оперативности и точности при постановке диагноза в сфере заболеваний системы крови.

Выявленное цитопротекторное действие физиологических доз глутатионовых ДНКЖ может служить предпосылкой для применения этих метаболитов NO в качестве стабилизаторов эритроцитов при проведении фотодинамической терапии и при консервировании донорской крови. Использование этих комплексов может изменить характеристики зависимости «доза-ответ» эритроцитов, а также увеличить зону стабилизации.

Полученные в работе ДНКЖ с карнозиновыми лигандами можно рассматривать как потенциально новый класс фармакологических препаратов, функциональные группы которого обладают синергетическим терапевтическим действием и позволяют корректировать метаболизм оксида азота и эффективно защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани при окислительном и нитрозативном стрессах.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- используемые методики исследования и проведённые расчёты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений, результаты получены на современном оборудовании и хорошо воспроизводимы;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы, отражают наиболее значимые результаты работы

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации.

Личный вклад Э.И. Насыбуллиной в представленную диссертационную работу заключался в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Диссертационная работа Э.И. Насыбуллиной выполнена на высоком методическом уровне с привлечением современных методов исследования и является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием достаточного количества публикаций в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ (4 статьи).

На заседании 22 июня 2017 года Диссертационный совет принял решение присудить Насыбуллиной Эльвире Ильгизовне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04. Биохимия.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 11 докторов биологических наук, 6 докторов химических наук (по специальности рассматриваемой диссертации), участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» присуждение ученой степени кандидата биологических наук - 18, «против» - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя Диссертационного совета ФИЦ биотехнологии РАН,
доктор биологических наук, профессор



М.С. Крицкий

Ученый секретарь Диссертационного совета ФИЦ биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

22 июня 2017 года