

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу  
Насыбуллиной Эльвиры Ильгизовны  
«Действие метаболитов оксида азота и карбонильных соединений на гемоглобин»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.04 - Биохимия**

Известно, что при многих метаболических нарушениях, приводящих к гипергликемии и кетонемии, в организме накапливаются активные карбонильные соединения и продукты глубокого гликирования аминокислот, белков и нуклеиновых кислот. Их влияние на физиологическую активность метаболитов оксида азота является одной из причин нарушения работы сердечно-сосудистой системы при диабете. Важным фактором, влияющим на функционирование оксида азота, является гемоглобин. Он участвует как в образовании, так и в элиминации оксида азота, выступает переносчиком оксида азота в форме нитрозотиолов или динитрозильных комплексов железа. Особенности эритроцитов увеличивают вероятность сочетания окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов. Эритроциты зависимы от потребления глюкозы, которая метаболизируется при гликолизе и в реакциях пентозофосфатного пути. Интремедиаты этих реакций – триозофосфаты являются источником активного дикарбонильного соединения – метилглиоксаля. Кроме того, при автоокислении гемоглобина образуется супероксид-анион, особенно при гипоксии, когда возрастает дезоксигенация гемоглобина и он становится более склонным к автоокислению. Дезоксигенированный Hb может продуцировать NO при восстановлении нитритов и нитросоединений, Все это создает предпосылки для развития окислительного и нитрозативного стрессов.

Еще одним фактором, влияющим на функции Hb, является его переход в мембраносвязанное состояние. Последние данные показывают, что связывание гемоглобина с компонентами мембраны имеет определенное биологическое значение: регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации кислорода и формирование сигнала об окислительном повреждении и старении эритроцита. Повышение доли мембраносвязанного Hb (МВHb) может быть обусловлено заболеваниями системы крови, вызванными как нарушениями структуры Hb, так и сбоями в системе антиоксидантной защиты, а также действием окислителей и гликирующих агентов. В связи с этим актуальность диссертационной работы Насыбуллиной Э.И., посвященной изучению влияния метаболитов оксида азота на процессы

неферментативного гликирования и функционирование гемоглобина в условиях карбонильного стресса, не вызывает сомнений.

Диссертация Насыбуллиной Э.И. построена по стандартному для кандидатских диссертаций плану, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы и, изложена на 151 странице, содержит 52 рисунка и 9 таблиц. Список цитируемой литературы включает 350 источников.

В обзоре литературы обобщены данные об описанных к настоящему времени гемоглобинах, их свойствах и функционировании, в том числе об участии в метаболизме оксида азота и его производных; о мембраносвязанном гемоглобине, и его потенциальном использовании в диагностике; дано описание карбонильного стресса (в том числе в эритроцитах), путей защиты от него и методов изучения, роль гемоглобина в этих процессах; дано описание методов анализа данных в используемых экспертных системах. Обзор полно освещает современное состояние исследуемой проблемы, которой посвящена диссертация.

Подробно описаны использованные в диссертационной работе аппаратура и методы проведения экспериментов. Приведенные сведения позволяют воспроизвести полученные результаты.

В разделе «Результаты и обсуждение» описаны результаты экспериментов по влиянию метаболитов оксида азота на реакцию неферментативного гликирования; по нитрозилированию и нитрованию гемоглобина в условиях, моделирующих реакцию Майяра; по переходу гемоглобина в мембраносвязанное состояние, а также по созданию компьютерной экспертной системы для диагностики анемий.

**Научная новизна.** В системе, моделирующей карбонильный стресс, было впервые показано увеличение выхода свободнорадикальных интермедиатов под действием нитрозотилолов. Такие редокс-активные соединения вызывали нитрозилирование гемоглобина и нитрование винильной группы порфирина, а также связывание Hb с компонентами мембраны. Установлено, что продукты взаимодействия метилглиоксаля с аминокислотными остатками гемоглобина и карнозина могут быть лигандами динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Ранее в литературе отсутствовали данные о способности оснований Шиффа участвовать в формировании ДНКЖ. Образование этих комплексов может быть причиной ингибирования процесса неферментативного гликирования метаболитами NO.

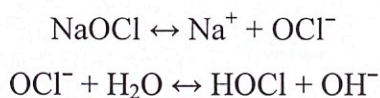
Было впервые предложено использовать уровень МВНб в качестве дополнительного показателя функционального состояния эритроцитов при хронической эндогенной интоксикации.

**Практическая значимость.** В диссертационной работе Насыбуллиной Э.И. предложено проводить оценку реактивности эритроцитов, учитывая данные по содержанию МВНб, а также использовать этот критерий в качестве дополнительного биохимического показателя выраженности интоксикационного синдрома. Предложена пилотная версия компьютерной экспертной системы, которая может быть основой для создания диагностического комплекса, используемого при постановке диагноза в сфере заболеваний системы крови. Показано цитопротекторное действие глутатионовых ДНКЖ, что позволяет применять их в качестве стабилизаторов эритроцитов при фотодинамической терапии и при консервировании донорской крови. Описан новый класс ДНКЖ с карнозином в качестве лиганда, которые обладают синергетическим действием и позволят корректировать метаболизм NO и защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани от различных стрессовых воздействий.

Считаю необходимым также высказать некоторые замечания к диссертационной работе Насыбуллиной Э.И.

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 %. Говориться, что наиболее сильно ингибировали реакцию соль Ангери (примерно на 70%), ДНКЖ-PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (примерно на 68%) и соль Ангери 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 наихудшее 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: модифицированный Hb + 600 мкМ ЖНКЖ-PO<sub>4</sub><sup>-</sup>). 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 МВHb измеряемый Hb – это связанный с мембраной, а не остаточный в результате недостаточно полной отмычки от цитоплазматического Hb?

9. Рис. 37, стр. 99. Видно, что HOCl сам по себе при низких концентрациях снижал Hb в растворе примерно на 2% по сравнению с уровнем автогемолиза. 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 автогемолизом. Другими словами, гемолизу подвержены только 3% клеток. Что это за клетки? Можно ли говорить в этом случае о гемолизе эритроцитов в целом? Возможно, это какие-то аномальные эритроциты, например, поврежденные при приготовлении суспензии клеток и т.п.?

В то же время все высказанные замечания не ставят под сомнение основные результаты выполненной работы и не снижают общей положительной оценки диссертации.

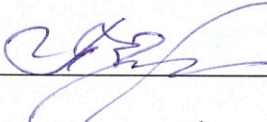
Диссертационная работа Насыбуллиной Э.И. выполнена на современном теоретическом и экспериментальном уровне. Результаты диссертации изложены в 4 статьях, опубликованных в российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат и опубликованные работы правильно отражают содержание диссертации. Материалы диссертации неоднократно докладывались на самых представительных научных конференциях.

Таким образом, диссертация Насыбуллиной Эльвиры Ильгизовны «Действие метаболитов оксида азота и карбонильных соединений на гемоглобин» является законченной научно-квалификационной работой, выполнена на высоком научно-методическом уровне и соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке

присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Насыбуллина Эльвира Ильгизовна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 –биохимия.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией физико-химических методов исследования и анализа  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины»  
Федерального медико-биологического агентства,  
д.б.н. по специальностям 03.00.04- Биохимия и 03.00.02 – Биофизика  
профессор

  
Панасенко Олег Михайлович

Адрес: г. Москва, 119435, ул. Малая Пироговская, д. 1а.  
Телефон: 8-(499)-246-44-90  
эл. почта: o-panas@mail.ru

Подпись д.б.н. профессора О.М. Панасенко заверяю

Учёный секретарь  
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины»  
Федерального медико-биологического агентства, кандидат биологических наук



Васильева Людмила Львовна

Тел: 8-(499)-246-91-65  
Эл. почта: vll@niifhm.ru

18 мая 2017 г