

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы. К настоящему времени хорошо известно, что при метаболических нарушениях, приводящих к гипергликемии и кетонемии, в организме человека и животных накапливаются активные карбонильные соединения и продукты глубокого гликирования аминокислот, белков и нуклеиновых кислот. Влияние этих соединений на физиологическую активность оксида азота является основной причиной нарушения вазодилатации при диабете. Важным фактором, влияющим на функционирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе, является гемоглобин, поскольку он может участвовать как в образовании, так и в элиминации оксида азота, а также выступать в качестве переносчика оксида азота в форме нитрозотиолов или динитрозильных комплексов негемового железа (ДНКЖ). Особенности метаболизма эритроцитов увеличивают вероятность сочетания окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов. В энергетическом отношении эритроциты зависимы от потребления глюкозы, которая метаболизируется в реакциях гликолиза и пентозофосфатного шунта. Такие интермедиаты этих реакций, как триозофосфаты, являются основным источником активного дикарбонильного соединения – метилглиоксаля. В результате спонтанного автоокисления гемоглобина в эритроцитах постоянно образуются супероксидные анион-радикалы. Этот процесс может усиливаться в условиях гипоксии, когда возрастает дезоксигенация гемоглобина и конформационное R-T равновесие сдвигается в сторону T-формы, более склонной к автоокислению. При этом дезоксиHb, восстанавливая нитриты и нитросоединения, может продуцировать NO. Одновременное образование в эритроцитах супероксида и оксида азота, а также наличие восстановленного железа в составе гемовой группы и железа, высвободившегося при окислительной деградации Hb, создают предпосылки для развития окислительного и нитрозативного стрессов. В этих условиях образуются нитрозотиолы и ДНКЖ, связанные с гемоглобином, и низкомолекулярные комплексы, связанные с глутатионом. Исходя из этого, изучение влияния разных форм оксида азота на процессы неферментативного гликирования и функционирование Hb в условиях карбонильного стресса является актуальным. Поэтому тема диссертационной работы Насыбуллиной Э.И., посвященной изучению влияния оксида азота на процессы неферментативного гликирования и функционирование гемоглобина в условиях карбонильного стресса, также несомненно является актуальной.

Научная новизна диссертации состоит в том, что в системе, моделирующей карбонильный стресс, впервые было показано увеличение выхода свободнорадикальных интермедиатов под действием нитрозотиолов, при этом подобные редокс-активные соединения вызывали нитрозилирование гемоглобина и нитрование винильной группы порфирина, а также присоединение гемоглобина к компонентам мембраны. Установлено, что продукты взаимодействия метилглиоксаля с аминокислотными остатками гемоглобина и карнозина могут

быть лигандами динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Следует отметить, что до настоящего времени в научной литературе отсутствовали факты, описывающие способность оснований Шиффа участвовать в формировании ДНКЖ. Образование подобных комплексов может быть одной из причин ингибирования реакции неферментативного гликирования метаболитами оксида азота. В работе впервые было предложено рассматривать уровень связанного с мембранами гемоглобина в качестве дополнительного критерия оценки функционального состояния эритроцитов при хронической эндогенной интоксикации.

Практическая значимость диссертации состоит в том, что в данной работе было предложено производить оценку реактивности эритроцитов по содержанию мембраносвязанного гемоглобина, а также использовать этот критерий в качестве дополнительного биохимического показателя выраженности интоксикационного синдрома. Предложенная автором работы пилотная версия компьютерной экспертной системы, учитывающая данные о мембраносвязанном гемоглобине, может послужить основой для создания диагностического комплекса, направленного на повышение оперативности и точности при постановке диагноза в сфере заболеваний сердечно-сосудистой системы. Далее, в работе выявлено цитопротекторное действие глутатионовых ДНКЖ в физиологических дозах, что позволяет применять их в качестве стабилизаторов эритроцитов при проведении фотодинамической терапии и при консервировании донорской крови. Кроме того, получен и исследован новый класс ДНКЖ с карнозиновыми лигандами, обладающих синергетическим терапевтическим действием, позволяющим корректировать метаболизм оксида азота и защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани от различных видов стресса.

Общая характеристика и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа построена по стандартной схеме, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований автора и их обсуждения, а также заключения, выводов и списка литературы. Она изложена на 151 странице машинописного текста, содержит 52 рисунка и 9 таблиц, список литературы включает в себя 350 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов.

Во введении сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы актуальность темы, научная новизна и практическая значимость диссертационной работы. В главе 1 (Обзор литературы) автором обобщены сведения об известных в настоящее время гемоглобинах, их классификации, об участии гемоглобинов в метаболизме оксида азота, приводятся данные о мембраносвязанном гемоглобине, его физиологической роли, а также о его потенциальном использовании в целях клинко-биохимической диагностики. Далее, автором даётся понятие карбонильного стресса и путей защиты от него, представлены основные экспериментальные подходы для его изучения. Кроме того, в этой главе приводятся сведения о роли гемоглобина в условиях карбонильного стресса в эритроцитах. В другом разделе данной главы автором представлены современные данные о компьютерных экспертных системах и методах анализа данных с использованием этих программ. Обзор литературы достаточно полно освещает текущее состояние дел в вопросах, решению которых посвящена диссертация.

В главе 2 (Материалы и методы) дано подробное описание использованных в исследовании реагентов, аппаратуры, методик синтеза и проведения экспериментов. Из данного раздела диссертации следует, что работа выполнена на современном методическом уровне, причём экспериментальные подходы можно охарактеризовать, как адекватные поставленным задачам исследования.

В главе 3 (Результаты и обсуждение) приводится изложение результатов собственных исследований автора. В данном разделе представлены результаты экспериментов, связанных с изучением влияния метаболитов оксида азота на реакцию неферментативного гликирования (реакция Майяра). Далее, автором проведён анализ процессов нитрозилирования и нитрования гемоглобина в условиях, моделирующих реакцию Майяра, а также его трансформации из растворимого в мембраносвязанное состояние в условиях различных видов стресса. Кроме того, в этой главе приводится описание созданной автором компьютерной экспертной системы для диагностики анемий. В конце работы сделано заключение, сформулированы выводы, и представлен список литературы.

Оценивая данную работу в целом, следует отметить, что в ней изложен обширный экспериментальный материал, что демонстрирует большой объем проведенных автором исследований, а также приводится квалифицированное обсуждение полученных данных на основе современных научных представлений. Все это в совокупности обеспечивает высокую степень достоверности полученных в работе результатов и сформулированных на их основе новых научных представлений. Выводы диссертационной работы представляются вполне корректными и обоснованными. Работа написана хорошим научным языком, её оформление также не вызывает нареканий.

Замечания и недостатки работы

Считаю необходимым также указать на некоторые недостатки данной диссертационной работы. Принципиальных замечаний к работе я не имею. Как уже отмечалось выше, 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 графиках 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, тогда как на спектрах рисунка 18 сверхтонкая структура отсутствует. Считаю, что автору следовало бы привести более подробное объяснение полученного эффекта.

В отношении обсуждения результатов и выводов работы замечаний не имею. В заключение я хотел бы ещё раз отметить, что все сделанные мною замечания не

носят принципиального характера, не ставят под сомнение основные результаты диссертационной работы и её выводы, не снижают общей положительной оценки диссертации, и скорее имеют характер рекомендаций.

Заключение

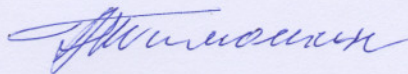
Диссертационная работа Насыбуллиной Э.И. выполнена на современном и высоком научном и методическом уровне, её результаты имеют несомненную научную и практическую ценность. Все основные результаты диссертации опубликованы в российских и зарубежных научных изданиях, они также неоднократно докладывались на научных конференциях. По её материалам автором опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации. Автореферат и опубликованные работы адекватно и достаточно полно отражают суть и содержание диссертации.

Таким образом, диссертация Насыбуллиной Э.И. «Действие метаболитов оксида азота и карбонильных соединений на гемоглобин» является законченной научно-квалификационной работой, соответствующей всем 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. Считаю, что ее автор, Насыбуллина Эльвира Ильгизовна, безусловно заслуживает присуждения ей искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 –Биохимия.

24 мая 2017 г

Официальный оппонент

ведущий научный сотрудник
лаборатории физико-химических методов исследования
НИИ экспериментальной кардиологии
ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Министерства здравоохранения Российской Федерации
доктор биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика



Тимошин Александр Анатольевич

Адрес: 121552, г. Москва, 3-я Черепковская ул., 15А.
Тел: +7(495)4147254 Эл. почта: timoshin_a_a@mail.ru

Подпись в.н.с., д.б.н. А.А.Тимошина заверяю.

Учёный секретарь
НИИ экспериментальной кардиологии
ФГБУ "РКНПК" Минздрава России

Тел: +7(499)1490091 Эл. почта: levashova.sonya@mail.ru



С.А.Левашова