



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора Федерального
государственного учреждения

«Федеральный
исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

18.07.2023

№ 85-01-19/590

На №

от



д.б.н. Федоров А.Н.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Пугаченко Игоря Сергеевича «Влияние метаболитов оксида азота на окислительную модификацию белков и липидов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия. Работа выполнена в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота института Биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Актуальность работы

Оксид азота (NO) – газообразная липофильная молекула, образующаяся в ферментативных и неферментативных реакциях. NO благодаря взаимодействию с гемовыми и негемовыми железосодержащими центрами белков проявляет сигнальные функции, регулируя многие физиологические процессы. Также NO непосредственно реагирует со свободными радикалами, что может иметь как про-, так и антиоксидантный эффект.

NO в организме может существовать в виде различных биологически активных метаболитов, среди которых можно выделить динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) и нитроксил (HNO). ДНКЖ являются физиологической формой депонирования и транспорта NO в живых организмах. ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами (RS-ДНКЖ) характеризуются формулой $[(RS^-)_2-Fe^{2+}-(NO)(NO^+)]$, в которой нитрозильные лиганды представлены молекулами NO и катионами нитрозония (NO⁺) в равных пропорциях. ДНКЖ могут быть связаны как с низкомолекулярными соединениями, так и с белками. Чаще всего лигандами этих комплексов являются глутатион и цистеин, а при связи с белками – аминокислотные остатки цистеина и гистидина.

RS-ДНКЖ оказывают мощное вазодилаторное и гипотензивное действие, протекторное действие на миокард при экспериментальном инфаркте миокарда, пенис-эректильное действие, протекторное действие при геморрагическом шоке, а также повышают эластичность эритроцитов и ускоряют заживление кожных ран. Уже разработан и прошел клинические испытания гипотензивный препарат «Оксаком», основой которого является биядерный ДНКЖ с глутатионом.

Разнообразная биологическая активность RS-ДНКЖ обусловлена их способностью выступать в биосистемах в качестве доноров NO и NO⁺, которые являются универсальными регуляторами различных метаболических процессов. Включение этих малых сигнальных

молекул в ДНКЖ обеспечивает их стабилизацию и транспорт в тканях без самопроизвольного высвобождения. Также ДНКЖ позволяют избирательно передавать NO и NO⁺ на гем- и тиолсодержащие белки.

В процессе формирования ДНКЖ образуется протонированная форма нитроксильного аниона – нитроксил (HNO). В биологических системах нитроксил может образовываться и в других реакциях восстановления NO. Нитроксил обладает высокой биологической активностью, во многом перекрывающейся с действием NO или ONOO⁻. Особенно перспективно использование доноров нитроксила в качестве кардиопротекторных средств, поскольку они обладают гипотензивным действием, а также способны улучшать сократимость миокарда и ингибировать его гипертрофию.

Химические свойства NO и HNO позволяют их рассматривать также и в качестве антиоксидантов. Показано, что ДНКЖ эффективно перехватывают активные формы кислорода и азота в системах, моделирующих окислительный и нитрозативный стресс. Антиоксидантные свойства ДНКЖ кажутся парадоксальными, поскольку они содержат лабильно-связанное Fe²⁺, которое катализирует в реакции Фентона образование сильного окислителя OH[•]. В связи с этим необходимо исследовать антиоксидантное и прооксидантное действие ДНКЖ и HNO в различных экспериментальных системах.

Поскольку окислительный стресс тесно связан с карбонильным, то вещества с антиоксидантными и антирадикальными свойствами могут препятствовать протеканию реакций неферментативного гликирования биомолекул. Было показано, что ДНКЖ с тиоловыми лигандами обладают таким действием. Возможно, что и нитроксил может выступать в роли ингибитора образования конечных продуктов гликирования (КПГ). Поэтому представляется актуальным изучение действия доноров нитроксила на модификацию белков окислением и гликированием.

Целью данной работы является изучение влияния метаболитов оксида азота (динитрозильных комплексов железа и нитроксильного аниона) на свободнорадикальную модификацию белков и липидов в условиях, моделирующих окислительный и карбонильный стресс.

Научная новизна

Получены новые данные о влиянии физиологических метаболитов оксида азота, ДНКЖ и нитроксила, на процессы свободнорадикального окисления липидов и окислительной модификации белков. Показано, что благодаря антиоксидантному и антирадикальному действию нитроксил замедляет реакции неферментативного гликирования белков. Зарегистрировано образование ДНКЖ, связанных с железосодержащими белками, при воздействии на митохондрии активными формами кислорода и азота. Впервые показано, что нитроксил способен участвовать в регенерации альфа-токоферола, а также в образовании и регенерации динитрозильных комплексов железа.

Практическая значимость

В настоящее время доноры NO (ДНКЖ) и доноры нитроксила (HNO/NO⁻) рассматриваются в качестве потенциальных фармакологических агентов с широким спектром действия. Эти соединения хорошо себя зарекомендовали в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. В отличие от органических нитратов, традиционно используемых в медицине в качестве вазодилататоров, применение ДНКЖ и доноров нитроксила не приводит к возникновению толерантности к этим соединениям. В диссертационной работе показано, что эти метаболиты NO проявляют антиоксидантное и антирадикальное действие в различных белковых и липидных системах. Благодаря этому они также могут оказывать антигликирующее действие. Сочетание в ДНКЖ и нитроксиле кардио- и вазопротекторных свойств с антиоксидантными и антигликирующими может послужить основой для разработки фармакологических препаратов, обладающих синергетическим терапевтическим действием, которые будут эффективно защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани при карбонильном стрессе. Полученные результаты позволяют расширить область применения ДНКЖ и доноров нитроксила.

Полученные данные также могут помочь в понимании механизмов патологических состояний, связанных с гипергликемией, часто сопровождающейся усилением свободнорадикальных процессов в клетках и тканях.

Конкретное личное участие автора в получении научных результатов

Экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, получены при непосредственном участии автором на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

Степень достоверности результатов

Выводы, представленные в диссертации, полностью подтверждены экспериментальными данными. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Использованные методики исследования и проведённые расчёты корректны.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Представленная Пугаченко Игорем Сергеевичем диссертационная работа посвящена изучению влияния метаболитов оксида азота на окислительную модификацию белков и липидов. Работа соответствует специальности 1.5.4 Биохимия, по которой рекомендуется к защите.

Апробация

Материалы работы были представлены на 7 международных и 1 всероссийской конференциях. По теме диссертации опубликовано 8 статей, отражающих основной объём диссертационной работы, из них 4 в изданиях, удовлетворяющих требованиям п. 13 «Положения о присуждении учёных степеней» утверждённого Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842, и перечню рецензируемых журналов ВАК РФ.

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Shumaev K.B., Dudylyina A.L., Ivanova M.V., **Pugachenko I.S.**, Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: formation and antiradical action in heart mitochondria. // *BioFactors*. 2018. V. 44. N 3. P. 237-244. DOI: 10.1002/biof.1418 [Q1]
2. Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Влияние нитроксила на клетки *Escherichia coli*, выращенные в условиях карбонильного стресса. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. № 5. С. 1-8. DOI: 10.31857/S0555109922050117
3. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., **Pugachenko I.S.**, Novikova N.N., Topunov A.F. Antiglycation and antioxidant effect of nitroxyl towards hemoglobin. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. N 10. e2007. DOI: 10.3390/antiox11102007 [Q1]
4. **Пугаченко И.С.**, Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Действие пероксинитрита и гидропероксида *трет*-бутила на тиоловые лиганды динитрозильных комплексов железа. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 5. С. 440-449. DOI: 10.31857/S0555109923050148

Статьи в других рецензируемых научных изданиях:

1. **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К., Шумаев К.Б. Антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа с различными лигандами. // *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2018. Т. 5. № 3. С. 62-65.
2. Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Космачевская О.В., Новикова Н.Н., Топунов А.Ф. Антиоксидантное и антигликирующее действие доноров нитроксила в

- экспериментальных системах с метилглиоксалем. // *Актуальная биотехнология*. 2022. № 1. С. 219-222.
3. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Динитрозильные комплексы железа защищают гемоглобин и эритроциты от действия окислителей. // *Актуальная биотехнология*. 2022. № 1. С. 215-218.
4. Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Грачев Д.И., Насыбуллина Э.И., **Пугаченко И.С.**, Руге Э.К. Новые варианты динитрозильных комплексов железа. Антиоксидантное и антирадикальное действие. // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2022. Т. 7. № 4. С. 624-627. DOI: 10.29039/rusjbpc.2022.0572

Рекомендуемые оппоненты:

Муронец Владимир Израилевич, доктор биологических наук по специальности "Биохимия", профессор. зав. отделом биохимии животной клетки НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ


Васильева Светлана Васильевна, доктор биологических наук по специальности "Генетика". Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, главный научный сотрудник

Рекомендуемая ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет».

Диссертация «Влияние метаболитов оксида азота на окислительную модификацию белков и липидов» Пугаченко Игоря Сергеевича на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Заключение принято на совместном семинаре лабораторий биохимии азотфиксации и метаболизма азота, экологической и эволюционной биохимии, биоэнергетики, молекулярных основ биотрансформации Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путём открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 27 человек. Результаты голосования: «за» – 27 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет. Протокол №4 от «26» мая 2023 г.

Председатель
совместного семинара лабораторий,
д.б.н., проф.

 Юрина Н.П./

Секретарь
совместного семинара лабораторий,
к.б.н.

 /Насыбуллина Э.И./

«13» июля 2023 г.

