

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Владимира Израилевича Муронца на диссертацию Игоря Сергеевича Пугаченко «ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - «Биохимия».

Актуальность диссертации И.С. Пугаченко очевидна, поскольку посттрансляционные модификации белков являются важнейшим элементом регуляции всех процессов жизнедеятельности, причем в этой области исследований остается еще много белых пятен. Не меньшее значение имеет модификация липидов. В работе основное внимание уделено роли метаболитов оксида азота в окислительной модификации белков и липидов, что также весьма актуально, поскольку этот вопрос долгое время оставался менее популярным в сравнении с воздействием активных форм кислорода. И, наконец, очень важно, в том числе и в практическом плане, проведенное автором изучение взаимосвязи гликирования белков и их окисления под действием метаболитов оксида азота. Именно изучение очень сложной взаимосвязи разных способов посттрансляционной модификации белков является главной особенностью данной диссертации.

Диссертационная работа И.С. Пугаченко включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 186 страницах текста и хорошо иллюстрирована 45 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 352 источника на русском и английском языках.

Во введении автор хорошо раскрывает актуальность исследования, его новизну и научную значимость.

В обзоре литературы подробно разобраны три основные темы – окислительный стресс, метаболиты оксида азота (свойства, образование и воздействие) и карбонильный стресс. Обзор написан хорошо и интересно, хотя его объем, на мой взгляд, слишком велик для кандидатской диссертации – около 70 страниц. Обширный обзор литературы привел и к необходимости процитировать очень большое число статей – 352 источника. Такой обзор вполне годится для докторской диссертации, а часть его, касающаяся метаболитов оксида азота, следует опубликовать в виде журнальной статьи после небольшой доработки. Приятно видеть ссылки на отечественных корифеев А.Н. Баха, А.А. Красновского, Н.Н. Семенова, В.П. Скулачева и др. Такое, к сожалению, редко встречается теперь в диссертациях.

По обзору литературы и списку ссылок есть несколько замечаний. В обзоре есть много ссылок на обзорные статьи коллег по лаборатории по карбонильному стрессу. Раз это уже написано подробно, то можно было бы не пересказывать эти обзоры. В списке литературы довольно много статей в российских переводных журналах, на которые даны ссылки на английский вариант. Лучше было бы давать ссылку на русскую версию. Кстати, за ссылку на нашу статью спасибо, но она не в «Biochemistry», а в «Биохимии». Впрочем, импакт-факторы двух журналов уже практически сравнялись. Русские ссылки, конечно, надо давать до английских, как правильно сделано в списке сокращений. На стр. 61 последнем абзаце использованы все размерности в разных предложениях нМ, мкМ, нмоль/л (то есть, нМ) и даже несуществующая мМмоль/л (то есть, ммоль/л или мМ). При этом приведенные в трех предложениях значения не соответствуют друг другу. Например, по одним данным концентрация в плазме крови здоровых людей 50-150 нМ, а по другим - 500 нМ. Никакой четкой информации о концентрации метилглиоксаля в биологических

жидкостях и тканях из этого абзаца сделать невозможно, так как значения отличаются на несколько порядков, возможно, из-за путаницы в размерностях.

Раздел «Материалы и методы» написан очень хорошо и подробно. Однако иногда дается лишняя информация, например, несколько раз про спектрофлуориметр с указанием не только названия и фирмы, но и страны-производителя. Указывать страну для транснациональных компаний давно излишне. Кроме того, автор указывает источник питания «Эльф», но не уточняет какой прибор для электрофореза был использован. Подробное описание методов исследования, данное в этом разделе, позволяет убедиться в надежности и достоверности полученных диссертантом результатов.

Описание результатов, данное в последующих главах, производит благоприятное впечатление, как по сути, так и по форме изложения. Автором была поставлена и успешно решена весьма непростая задача, касающаяся не только роли метаболитов оксида азота в окислительной модификации белков и липидов, но и взаимосвязи этого процесса с карбонильным стрессом. Особый интерес представляет изучение роли динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) в исследованных процессах. С помощью различных методов, среди которых решающую роль играл электронный парамагнитный резонанс, автору удалось не только охарактеризовать ДНКЖ, но и выяснить их функцию. Так было доказано, что динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами ингибируют свободнорадикальное перекисное окисление в липопroteидах низкой плотности, липосомах и мицеллах из полиненасыщенных жирных кислот. Кроме того, динитрозильные комплексы железа с тиоловыми лигандами перехватывают пероксинитрит. Очень важен результат, доказывающий формирование ДНКЖ с тиоловыми лигандами в митохондриях. Существенный раздел диссертации связан с изучением функции нитроксила. Было установлено, что нитроксил участвует в регенерации альфа-токоферола, обладающего антиоксидантными свойствами, а также в образовании ДНКЖ с тиоловыми лигандами. Наиболее подробно было исследовано участие нитроксила в модификации гемоглобина.

Было установлено, что нитроксил снижает выход свободнорадикальных продуктов реакции гемоглобина с гидропероксидом трет-бутила, защищая тем самым гемоглобин от окислительной модификации. Чрезвычайно интересно, что диссертанту удалось связать процессы, в которых участвуют метаболиты оксида азота, с карбонильным стрессом. Было показано, что нитроксил ингибирует реакцию неферментативного гликирования гемоглобина метилглиоксалем. Более того, подобный эффект был обнаружен и на бактериальных клетках, при воздействии на которые нитроксил снижал токсическое действие метилглиоксаля, повышая жизнеспособность клеток и уменьшая количество связанных с белками продуктов неферментативного гликирования. Автор полагает, что антигликирующее действие нитроксила связано с его антиоксидантным и антирадикальным действием. В связи с этим выводом хотелось бы отметить, что антигликирующим воздействием могут обладать и соединения, модифицирующие аминокислотные остатки белков, являющиеся мишенями для метилглиоксаля и других гликирующих агентов. В этом случае наличие антигликирующей активности не свидетельствует о безвредности таких соединений. Следовательно, наряду с проверкой антигликирующего воздействия следует также отслеживать отсутствие других повреждений исследуемых белков.

По экспериментальной части диссертационной работы И.С. Пугаченко есть несколько вопросов и небольшие замечания. В этой части работы нет четкого разделения на результаты и обсуждение, что усложняет чтение текста. Кроме того, во многих разделах есть слишком обширное введение с большим количеством ссылок. Например, на 129-130 целая страница дублирует обзор литературы. Обсуждение каждого полученного результата также слишком подробное. Выражение «нами показано» нельзя использовать при ссылке на статьи лаборатории, в которых диссертант не принимал участия. На стр. 113 – среди окисленных производных цистеина не упомянута сульфеновая кислота, которая имеет весьма важное значение. Хотелось бы узнать, по каким причинам использовались для

модификации столь высокие концентрации метилглиоксаля (54 мМ), да еще и в течении длительного времени. Эти условия явно далеки от реальных. Данные на рис. 3.3.2 не очень убедительны. Лучше было бы подтвердить их электрофорезом, а также пояснить присутствие странных пиков между димерами и мономерами. На стр. 138 следует пояснить фразу о «деградации белка из-за снижения количества димеров». В тексте есть ссылка на статью Космачевская и др. 2015, но этой работы я не нашел в списке статей. Мне кажется, что активация гликолиза не обязательно должна приводить к накоплению метилглиоксаля, как указано на стр. 147. Скорее это будет зависеть от интенсивности разных этапов гликолиза и связанных с ним метаболических путей. На стр. 151 – упомянутая 1,3-дифосфоглицератдегидрогеназа – это или киназа, или не ключевой фермент гликолиза.

Высказанные в отзыве замечания носят рекомендательный характер и не умаляют ценности интересного и важного исследования, проведенного И.С. Пугаченко.

Достоверность и значимость полученных результатов обусловлена грамотным использованием современных биохимических методов исследования, а также разумным планированием экспериментов и адекватной оценкой полученных результатов.

Выводы диссертационной работы научно обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам. Полученные результаты не вызывают сомнений в объективности и достоверности. Статистическая обработка данных проведена корректно с использованием современных методов.

В целом, результаты диссертационной работы характеризуются высокой степенью новизны и имеют существенную теоретическую и научно-практическую значимость.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, хорошо обоснованы и полностью подтверждены приведенными экспериментальными результатами.

Основные результаты диссертации опубликованы в научной печати. Так, по теме диссертации опубликовано 8 журнальных статей, в том числе 4 статьи в изданиях,

рекомендованных ВАК РФ (2 статьи в журнале «Прикладная биохимия и микробиология», 1 статья в журнале «Antioxidants» и 1 в журнале «BioFactor»). Кроме того, результаты работы были представлены на различных научных конференциях, тезисы докладов которых также были опубликованы.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Заключение. Диссертационное исследование «ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи, важной для развития биохимии.

По актуальности, использованию широкого набора методов, новизне, объему экспериментальных данных, научной и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует критериям, предъявляемым к диссертациям, установленным Разделом 2 (п.9-14) «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации, от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции от 18.03.2023 г.), а её автор Игорь Сергеевич Пугаченко заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия».

Доктор биологических наук, профессор,

заведующий отделом биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,

Контактные данные:

Адрес: Москва, 119992, Ленинские горы, дом 1, строение 40,

рабочий e-mail: [vimuronets@belozersky.msu.ru](mailto:vimuronets@belozersky.msu.ru)

рабочий телефон: +7(495) 939-14-56,

Специальность, по которой официальным оппонентом была защищена диссертация:

03.01.04 – «биохимия»

Владимир Израилевич Муронец



22 января 2024 г.

Подпись В.И. Муронца заверяю

и.о. директора

научно-исследовательского института

физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Московского государственного университета

имени М.В. Ломоносова

член-корреспондент РАН

  
И.В. Сергиев

