

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Пугаченко Игоря Сергеевича** «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 темы. Анализ научных публикаций свидетельствует о том, что в наше время по-прежнему очень актуальна информация о молекулярно-генетических и биохимических проблемах Жизни и раскрытии явлений, механизмов и тайн, включающих короткоживущие молекулы – внутриклеточные мессенджеры. Прежде всего это структуры оксида азота (NO) и его метаболитов.

Интерес к указанным соединениям изначально возник с мировым открытием роли NO как непосредственного участника процессов сосудистой релаксации и далее развивался с утверждением функций NO как молекулы - мессенджера абсолютно нового типа.

NO это уникальная молекула для физиологии, микробиологии, генетики, иммунологии и всех остальных разделов медицины. Его универсальная активность обусловлена малым размером, своеобразной электронной конфигурацией и способностью к диффузии. NO это свободный радикал с коротким полупериодом жизни, липофильная молекула, которая легко диффундирует через мембраны, что необходимо для мессенджера. В настоящее время известны десятки высокостабильных кристаллических доноров оксида азота, и российские ученые являются лидерами этого направления науки.

Области фундаментального изучения биологической и химической активности NO многочисленны. Ряд разделов – особенно в медицине – успешно развивается, и многие вопросы удалось решить. Стала все более

очевидной научная, социальная и экономическая эффективность детального изучения глобальных проблем NO, учитывая, в том числе, влияние его метаболитов на процессы окислительной модификации белков и липидов. На основе вышеуказанного можно заключить, что экспериментальная работа И.С. Пугаченко, выполненная на совокупности объектов - in vitro, клетках бактерий, млекопитающих и человека, посвящена изучению важнейшего и интереснейшего объекта, а представленные в диссертации результаты и практические рекомендации, бесспорно, обладают **научной новизной.**

Дополнительную ценность работе придает изучение кинетики процессов и явлений, особенно когда дело касается неинвазивных методов, не связанных с внесением дополнительных меток и регуляторов.

Полученные в представленной к защите работе И.С. Пугаченко данные являются **актуальными** и для биохимии, и для биологии в целом, а полученные результаты будут, несомненно, замечены, учтены и использованы и в родственных областях науки.

Структура диссертации и автореферата

Диссертационная работа Пугаченко И.С. написана по традиционному плану. Ее текст содержит: список сокращений, введение, обзор литературы (Глава 1), использованные объекты, материалы и методы исследования (Глава 2), результаты и обсуждение (Глава 3), заключение и список литературы, который включает 352 источника отечественной и зарубежной литературы. Материал изложен на 186 страницах текста, содержит 45 рисунков и 1 таблицу. **Автореферат** соответствует основным положениям и выводам диссертации и включает список публикаций автора - 8 тезисов и 8 статей, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ. **Автореферат** написан понятным языком и хорошо иллюстрирован.

При рассмотрении весьма детального **Обзора литературы** по структуре и функциям оксида азота в этой аудитории нет необходимости перечислять

разнообразии проявлений активности NO и его метаболитов. Главное нашло отражение в Обзоре.

Естественно, что основное место занимает информация об объектах и методах проведения экспериментального исследования, результатах и их анализ. Много внимания уделено насущной проблеме неферментативного гликирования с рассмотрением основных достижений, имеющихся и авторских рекомендаций.

Огромный экспериментальный материал о функциональной активности NO уже поставил вопрос, какие физико-химические свойства этого агента, возникающего эндогенно в ходе ферментативного синтеза в форме нейтральных молекул NO/ и его метаболитов, определяют способность оказывать на организм как уникальное позитивное регуляторное, так и негативное цитотоксическое действие.

Научно-практическая значимость работы

Автором проделана огромная работа по получению и анализу результатов в соответствии с заявленной целью и задачами работы - влияния метаболитов NO –ДНКЖ и нитроксил - аниона на свободно-радикальную модификацию белков и липидов в условиях, моделирующих окислительный и карбонильный стрессы:

- получены **новые данные** об активности ДНКЖ с различными лигандами - глутатионом, N- ацетилцистеином, липоевой кислотой и фосфатом - в процессах свободно радикального окисления липидов и окислительной модификации белков;

- **впервые** образование парамагнитных ДНКЖ с цистеиновыми лигандами и характерным анизотропным ЭПР сигналом из семейства $g=2.03$ (ДНКЖ) было установлено в инкубационной среде с митохондриями из сердца крысы, S - нитрозоцистеином, железом и избытком цистеина (при продувке образца азотом). О наличии Cys -ДНКЖ судили по форме сигнала ЭПР. (Ранее в митохондриях была установлена генерация оксида азота митохондриальной NO- синтазой (mt NOS). (Litvinova et al., 2015).

Большое внимание в работе (в 4-х из 7 выводов) отведено изучению механизмов антиоксидантного и антигликирующего действия нитроксила HNO . Донором нитроксила в исследованиях была часто изучаемая соль Ангели, которая при физиологических рН присутствует в протонированной форме.

Установлена важная роль нитроксила в регенерации ДНКЖ и синтезе этих комплексов в суспензии изолированных митохондрий сердца крысы в аэробной и анаэробной средах.

Впервые установлено, что нитроксил замедляет реакции неферментативного гликирования белков и участвует в регенерации липофильного антиоксиданта альфа – токоферола.

Принимая во внимание отсутствие в литературе данных о влиянии нитроксила на гликирование белков метилглиоксалем, было **впервые** изучено взаимодействие нитроксила с белком гемоглобином эритроцитов в системе с моделированием карбонильного стресса.

Значительным научно-практическим результатом работы являются материалы раздела по экспериментальному поиску и использованию новых препаратов - ингибиторов реакции неферментативного гликирования и образования высокотоксичных конечных продуктов (КПГ).

Рядом взаимодополняющих экспериментов установлено, что соль Ангели ингибирует образование свободно - радикальных продуктов при деградации гемовой группы в реакции гемоглобина с метилглиоксалем и образование комплекса нитрозил/ Hb. Убедительно доказано, что нитроксил снижает общий уровень окислительного стресса и объем повреждения молекул, вызванных неферментативным гликированием.

В качестве вопроса автору хотелось бы задать следующий: Полноценный обзор литературы и высокая научная значимость экспериментальных результатов работы выиграли бы от включения краткой информации о несомненно важной проблеме.

По мере роста объема информации о распространении применения газообразного NO для медицинских исследований все чаще встает вопрос, в какой мере имитация активности газообразного NO и легко синтезируемых химическим путём ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами, как доноров NO и NO⁺, **характерна для экзогенного NO** при его включении в клеточные ДНКЖ ? Основанием для размышления и ответа на вопрос может явиться, в частности, информация о гипотензивной активности газообразного NO, которая при ингаляционном введении агента обнаруживается только в малом круге кровообращения, т. е. только в лёгких (Сс.3,4), а для «живого» эндогенного NO такая активность характерна в отношении всей системы кровообращения. [Сс. Fratacci M.D., Frostell C.G., Chen T.-Y. Wain J.C., Robinson D.R., Zapol W.H. (1991) Inhaled nitric oxide. *Anesthesiology*, **75**, 990-999 ; ..Semigran M.J., Cockrill B.A., Kacmarek R., Tompson B.T., Zapol W.H., Dec G.W., Fifer M.A.(1994) Hemodynamic effect of inhaled nitric oxide in heart failure. *J. Amer. Coll Cardiol.* **24**, 982-988].

Хотелось бы, чтобы автор диссертации охарактеризовал свою позицию по этому очень важному вопросу, тем более, что научная эрудиция автора вполне этому способствует.

Научные положения и выводы диссертационной работы базируются на обширном экспериментальном материале и не противоречат данным литературы в области биохимии и микробиологии. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с привлечением новейших и ряда уникальных методов. Достоверность результатов не вызывает сомнений.

Материалы диссертации были представлены на солидных конференциях, опубликованы в журналах перечня ВАК и международных изданиях с высоким индексом цитирования. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа **И.С. Пугаченко** «Влияние метаболитов оксида азота на окислительную модификацию белков и липидов» соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, она объединена общей идеей, содержит новые научные результаты и выводы, выдвигаемые для публичной защиты, и свидетельствуют о значительном и важном вкладе в науку. Работа **Пугаченко И.С.** содержит решение задач, имеющих существенное значение для биохимии и биотехнологии и медицины.

По актуальности поставленных целей, новизне результатов и их теоретической и практической значимости работа удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. и паспорту заявленной специальности 1.5.4. Биохимия, а ее автор **Пугаченко Игорь Сергеевич** заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (по специальности Генетика)

Гл. н.с. ИБХФ РАН

Васильева Светлана Васильевна

Подпись Васильевой С.В. заверяю:

Ученый секретарь ИБХФ РАН

Кандидат биологических наук



06.02.2024₂

Скалацкая С.И.