

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки института
физиологически активных веществ
Российской академии наук (ИФАВ РАН)
чл.-корр. РАН _____



С.О. Бачурин
С.О. Бачурин

« 08 » сентября 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук на диссертационную работу **Соколовой Екатерины Михайловны** «Кинетические закономерности и физико-химические механизмы взаимодействия биядерных тетранитрозильных комплексов железа – доноров оксида азота с эритроцитами», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Более чем столетний период использования в клинической практике сосудорасширяющих препаратов на основе органических нитратов и нитритов, наиболее известным из которых является нитроглицерин, выявил у них ряд серьезных недостатков. Так, следствием длительного фармакологического применения таких препаратов является эффект толерантности, суть которого состоит в постепенном снижении физиологического отклика организма на применяемые дозы, что приводит к их многократному увеличению. После того как было установлено, что фармакологическое действие нитроглицерина и нитровазодилаторов в целом заключается в донировании ими оксида азота в ходе биотрансформации, появилась надежда, что эти препараты могут быть заменены другими донорами оксида азота, которые не обладают такими недостатками. В известной монографии В.Г.Граника и Н.Б.Григорьева «Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств» выделены 12 классов

потенциальных химических предшественников оксида азота. Биядерные тетранитрозильные комплексы железа с тиоловыми лигандами (Б-ТНКЖ), синтезированные в Институте проблем химической физики Российской академии наук, являются одним из таких классов NO-донорных соединений, рассматриваемых в качестве возможной альтернативы используемым в настоящее время органическим нитратам и нитритам.

К настоящему времени некоторые соединения с NO-донорными свойствами продемонстрировали хорошую эффективность в биологических моделях и в предклинических испытаниях. Тем не менее арсенал клинически применяемых вазодилататоров в целом пока сохраняется в неизменном виде. Это показывает, что реализация химически обусловленной NO-донорной активности в условиях организма сталкивается с проблемами, требующими проведения углубленных биофизических, биохимических и клинко-фармакологических исследований. Именно это обстоятельство определяет актуальность рецензируемой работы.

Диссертационная работа Е.М. Соколовой посвящена изучению взаимодействия представителей нового класса синтетических доноров оксида азота - биядерных тетранитрозильных комплексов железа с суспензией эритроцитов, выступающей в качестве модели внутреннего содержимого кровеносного сосуда, где реализуется фармакологический эффект экзогенных доноров NO в отношении сердечно-сосудистой системы.

Диссертационная работа изложена на 121 странице, содержит 30 рисунков и 2 таблицы и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), собственных исследований автора (главы 3-5), заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 198 наименований.

Глава 1 (литературный обзор) имеет семь разделов с внутренним делением на подразделы, т.е. хорошо структурирован. Необходимо отметить удачное представление материала, начинающееся от общих вопросов истории открытия сигнальной функции NO, эндогенного образования NO и механизмов

NO-сигнализирования (1-4 разделы) и заканчивающиеся разделами, посвященными пероксинитриту (5), гемопротеидам (6) и донорам оксида азота (7), которые непосредственно вводят в курс проблем, рассматриваемых в экспериментальных разделах работы.

В **Главе 2** представлена методическая часть. В основу методологии работы был положен кинетический подход к исследованию двух различных аспектов взаимодействия Б-ТНКЖ с эритроцитами: исследование кинетики донирования NO и исследование кинетики гемолиза эритроцитов. На основе анализа кинетических закономерностей указанных процессов устанавливаются количественные критерии оценки гемолитической активности и NO-донирующей способности Б-ТНКЖ.

Главы 3-5 содержат собственные результаты автора. В ходе экспериментальных исследований были обнаружены два явления, каждое из которых в ходе последующего анализа автор вначале соотносит с отдельным самостоятельным типом взаимодействия Б-ТНКЖ с эритроцитами, а затем устанавливает механизм каждого из указанных типов взаимодействий. Для обоснования предложенных механизмов автор привлекает адекватные теоретические подходы: метод кинетического моделирования и базовые положения теории мономолекулярной адсорбции Лэнгмюра.

В **Главе 3** установлено, что пять из шести изученных нитрозильных комплексов, при добавлении к 0.2%-ной суспензии эритроцитов, показали гемолитический эффект, ослабевающий с ростом гематокрита суспензии. Условия и механизм гемолитического действия Б-ТНКЖ были подробно изучены, и на основе анализа кинетических и концентрационных закономерностей гемолитического процесса был сделан предварительный вывод о том, что источником гемолитической активности комплексов является выделяемый ими оксид азота, а непосредственным химическим индуктором, вероятно, является пероксинитрит, образующийся из оксида азота в ходе биохимической трансформации.

Глава 4 логически вытекает из предыдущей и посвящена обоснованию предположения о пероксинитритзависимом механизме гемолиза эритроцитов.

Основу химического взаимодействия оксида азота с внутренним содержимым клетки составляет быстрая реакция с оксигемоглобином, приводящая к его окислению до нитрат-аниона. В целом же химическое взаимодействие Б-ТНКЖ с суспензией эритроцитов может быть представлено в виде двух последовательных реакций: (1) гидролитическое разложение комплекса с выделением NO и (2) химическое улавливание выделяющегося оксида азота оксигемоглобином с образованием метгемоглобина и нитрат-аниона. При этом скорость образования метгемоглобина в данной системе, как обосновывает автор, может количественно характеризовать скорость NO-донирующая, как лимитирующей стадии, т.е. служить количественной оценкой NO-донирующей способности Б-ТНКЖ.

Первичное сопоставление гемолитической активности и NO-донирующей способности исследуемых Б-ТНКЖ не позволило усмотреть какого-либо однозначного соотношения между этими характеристиками, в силу, как считает автор, сложного характера биохимических превращений, в которые вовлекается оксид азота внутри эритроцита. Основные пути биохимической трансформации оксида азота в эритроците представлены автором виде кинетической схемы (рис. 4.2, стр. 68), включающей также реакцию автоокисления оксигемоглобина с образованием супероксидного анион-радикала и его последующее взаимодействие с оксидом азота с образованием пероксинитрита. Далее методом кинетического моделирования с опорой на известные из литературы константы скорости были получены теоретические временные зависимости образования пероксинитрита внутри эритроцитов в условиях гемолитических экспериментов. Результаты моделирования позволили наглядно продемонстрировать граничные условия возникновения гемолитического эффекта Б-ТНКЖ и подтвердить предположение о пероксинитрите как индукторе гемолиза.

Второй вид взаимодействия Б-ТНКЖ с эритроцитами, обнаруженный в заключительной **Главе 5** данной работы автор называет физико-химическим, подчеркивая этим, что он, в отличие от предыдущего, основан на слабых, как оказалось, гидрофобных взаимодействиях. Речь идет о связывании части молекул комплекса с эритроцитами с образованием в системе двух равновесных пулов комплекса свободного и мембраносвязанного. Сам по себе, такой вид взаимодействия низкомолекулярных ксенобиотиков, многих лекарств, с компонентами крови, включая клетки, удивления не вызывает. Его можно считать обычным явлением. Однако в случае с Б-ТНКЖ такое связывание, как оказалось, имеет совершенно необычные последствия. Автор приводит доказательства в пользу того, что связывание комплекса с поверхностью клетки приводит к снижению NO-донирования, т.е. влияет на основную фармакологическую функцию Б-ТНКЖ. Именно это явление в виде эффекта «дрейфа» эффективной константы скорости образования метгемоглобина было обнаружено в **главе 5** (разд.5.1) при исследовании кинетики образования метгемоглобина суспензиями эритроцитов различного гематокрита. Автор объясняет это тем, что распад Б-ТНКЖ с выделением в среду свободного NO происходит по механизму гидролитической диссоциации, т.е. с участием молекул воды. С учетом этого, связывание Б-ТНКЖ с мембраной клетки будет в той или иной степени ограничивать контакт комплекса с водной средой.

На основе проведенных исследований автор работы делает важный в теоретическом и практическом отношении вывод: NO-донирующая способность Б-ТНКЖ зависит не только от структурно-химических характеристик комплекса, но и от физико-химических взаимодействий комплекса с компонентами биологической среды.

Этот результат, действительно, представляется наиболее существенным и важным в данной работе, так как из него вытекает целый ряд практических следствий, создающих хорошую основу для постановки и решения прикладных задач в данной области. А именно, установленное в данной работе влияние

фактора липофильности S-лигандов на NO-донирующую способность комплексов следует учитывать в прогнозе фармакологической активности конкретного Б-ТНКЖ. И наоборот, базовая структура донора на основе Б-ТНКЖ может быть оптимизирована подбором соответствующих S-лигандов с учетом конкретного объекта фармакологического воздействия. Так, в фармакологической практике для купирования острого повышения артериального давления (гипертонический криз) необходимы «быстрые» доноры NO, подобные исследованному в данной работе комплексу ПЕН. В то же время терапии хронических форм ишемической болезни сердца требует применения препаратов пролонгированного действия, в качестве которых могли бы использоваться Б-ТНКЖ с липофильными лигандами.

В целом диссертация написана хорошим языком с необходимой степенью детализации и аргументированности. Представленный в ней иллюстративный материал нагляден и удобен для восприятия. Все полученные в работе результаты являются новыми, а их достоверность обусловлена применением современного оборудования и надежных методов исследования.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации, в нем отражены главные идеи исследования и представлены научные выводы.

По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе в виде статей в отечественных и международных журналах, входящих в список ВАК, и тезисов докладов конференций различного уровня.

В качестве замечаний отметим недостаточное применение статистической обработки результатов. Кроме того, в целом убедительное обоснование механизма гемолиза под действием Б-ТНКЖ как пероксинитритзависимого процесса, запускаемого выделяющимся из комплекса оксидом азота, получило бы окончательное подтверждение, если бы удалось продемонстрировать эффект гемолиза под действием чистого оксида азота, чего не было сделано. Как известно, в эритроцитах с высокой скоростью происходит дисмутация супероксидного анион радикала под действием


супероксиддисмутазы. Почему эта реакция не учтена в кинетической модели генерации пероксинитрита?

Высказанные замечания не влияют на общее положительное впечатление от диссертационной работы и не ставят под сомнение обоснованность ее основных положений и выводов.

Давая общую оценку диссертации Е.М. Соколовой, можно констатировать, что она представляет собой законченную научно-квалификационную работу, содержащую решение важной для биофизики и ряда смежных областей задачи по изучению кинетических закономерностей и физико-химических механизмов взаимодействия представителей нового класса экзогенных доноров оксида азота - биядерных тетранитрозильных комплексов железа с эритроцитами. Диссертационная работа Е.М. Соколовой удовлетворяет критериальным требованиям, установленным пунктами 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Настоящий отзыв обсужден и принят на научном семинаре сотрудников Отдела медицинской и биологической химии ИФАВ РАН. Присутствовало на заседании 11 чел. Результаты голосования: «за» – 11 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет, протокол № 6 от 05 сентября 2016 г.

Составитель отзыва Григорьев Владимир Викторович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией нейрорецепции Отдела медицинской и биологической химии ИФАВ РАН.

 (В.В.Григорьев)

Адрес: 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, 1. Тел.: 8(49652)4-25-46, e-mail: ipac@ipac.ac.ru