

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Тимошина Александра Анатольевича о диссертационной работе Соколовой Екатерины Михайловны на тему «Кинетические закономерности и физико-химические механизмы взаимодействия биядерных тетранитрозильных комплексов железа – доноров оксида азота с эритроцитами», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

### **Актуальность темы**

Известно, что оксид азота является важным регулятором многих метаболических процессов в организме. В сердечно-сосудистой системе наиболее важными эффектами NO являются их вазодилататорное и антиоксидантное действия. В клинической практике более ста лет успешно применяются препараты на основе органических нитратов, при введении которых в организм происходит выделение NO. Тем не менее, к настоящему времени многими исследователями успешно проводятся работы, связанные с поиском и разработкой новых препаратов-доноров NO, а также анализом механизмов их действия. Целью таких исследований является обычно создание высокоэффективных и безопасных препаратов, анализ их избирательности действия и т.д.

В настоящее время в Институте проблем химической физики РАН синтезированы и активно изучаются представители нового класса экзогенных доноров оксида азота – биядерные тетранитрозильные комплексы железа (Б-ТНКЖ) с тиолсодержащими лигандами на основе азагетероциклических тиолов и алифатических тиоаминов. Выделение оксида азота указанными комплексами не требует какого-либо внешнего воздействия (фото-, термо- или ферментативной активации) и происходит в ходе спонтанной диссоциации в водной среде.

В рамках диссертационной работы Соколовой Екатерины Михайловны проведено исследование взаимодействия данных комплексов с эритроцитами. Актуальность темы данной диссертационной работы не вызывает сомнений и определяется следующим. Во-первых, автором в стандартных экспериментальных условиях проведено сравнительное исследование различных препаратов-доноров NO на основе Б-ТНКЖ, что имеет, несомненно, как научное, так и практическое значение. Во-вторых, Е.М.Соколовой выполнено параллельное исследование как положительного действия исследуемых препаратов (высвобождение NO), так и их отрицательного действия (иницирование гемолиза эритроцитов в результате образования избытка NO), что крайне важно и актуально, учитывая дихотомическое действие оксида азота в биологических системах.

### **Цель и задачи работы**

Целью диссертационной работы Е.М.Соколовой было выяснение кинетических закономерностей и физико-химических механизмов взаимодействия биядерных тетранитрозильных комплексов железа (Б-ТНКЖ) с суспензией эритроцитов.

Для достижения данной цели автором были поставлены следующие задачи:

- ▶ Исследование кинетики гемолиза эритроцитов под действием Б-ТНКЖ в широком диапазоне их концентраций.
- ▶ Разработка методики оценки способности Б-ТНКЖ быть донором NO на основе измерения концентрации внутриэритроцитарного метгемоглобина.

- ▶ Анализ взаимосвязи между гемолитической активностью Б-ТНКЖ и его способностью быть донором NO.
- ▶ Исследование кинетики высвобождения NO в суспензиях эритроцитов с различным уровнем гематокрита.
- ▶ Исследование кинетики высвобождения NO в суспензиях эритроцитов с различной начальной концентрацией Б-ТНКЖ.
- ▶ Анализ механизмов влияния клеточной среды на способность Б-ТНКЖ быть источником NO.

### **Научная новизна диссертации**

В диссертационной работе Е.М.Соколовой получен ряд новых научных результатов:

- ▶ Разработана оригинальная методика оценки способности Б-ТНКЖ быть донором NO на основе исследования кинетики образования внутриэритроцитарного метгемоглобина.
- ▶ Впервые показано, что Б-ТНКЖ различной структуры вызывают гемолиз разбавленных (НСТ=0.2%) суспензий эритроцитов. Непосредственным индуктором гемолиза выступает, по-видимому, продукт биохимической трансформации оксида азота с участием оксигемоглобина – пероксинитрит.
- ▶ Установлено, что способность Б-ТНКЖ быть донором NO зависит не только от структурно-химических характеристик комплекса, но и от физико-химических взаимодействий комплекса с компонентами биологической среды.
- ▶ Впервые показано, что влияние клеточной среды на способность быть донором NO комплексов различной структуры зависит от уровня липофильности S-лигандов.

### **Научно-практическая значимость диссертации**

В результате данной работы были подробно исследованы процессы гемолиза эритроцитов в результате действия пероксинитрита при введении препаратов-доноров NO в условиях *in vitro*. Это создаёт основу для изучения действия фармакологических препаратов-доноров NO на кровь и её компоненты. Кроме того, разработанная автором методика количественной оценки способности исследуемых комплексов быть источником NO может быть использована для мониторинга различных субстанций, способных выполнять роль источника NO.

### **Практическая значимость диссертации**

Результаты данной работы создают хорошую фундаментальную научную основу для развития прикладных исследований, связанных с созданием новых препаратов-доноров NO с принципиально новым механизмом достижения пролонгированного эффекта высвобождения NO, основанном на связывании донора NO с компонентами крови. Кроме того, в результате сравнительного исследования различных препаратов-доноров NO автором установлено, что комплекс ПЕН (пеницилламин) является наиболее эффективным источником NO, что указывает на перспективы его применения как в качестве фармакологического агента, так и в качестве источника оксида азота в биохимических модельных системах.

## **Общая характеристика и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа Е.М.Соколовой построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), изложения собственных исследований автора (главы 3-5), заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 121 странице печатного текста, содержит 30 рисунков и 2 таблицы. Список литературы включает в себя 198 наименований, из них 174 англоязычных.

Во введении обоснована актуальность темы, четко сформулированы цель и задачи работы, охарактеризована научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Обзор литературы написан хорошим научным языком, приведённые автором материалы дают достаточно полное представление относительно проблематики исследования в описываемой области.

В следующей главе представлены основные материалы и методы исследования, применяемые автором данной работы. В этой главе представлено научное оборудование, описаны объекты и методы исследований. Из данного раздела диссертации следует, что работа выполнена на современном методическом уровне, причём экспериментальные подходы можно охарактеризовать, как адекватные поставленным задачам исследования.

Далее в работе следует изложение результатов собственных исследований. В основу методологии работы автором был положен кинетический подход к изучению взаимодействия экзогенных доноров NO с суспензией эритроцитов как модельной системой. В данной диссертационной работе автором обнаружены и успешно исследованы два типа взаимодействий исследуемых нитрозильных комплексов с суспензией эритроцитов.

Первый тип взаимодействия имеет чисто химическую природу и связан с воздействием на эритроциты свободного NO, претерпевающего внутри эритроцита биохимическую трансформацию с образованием пероксинитрита, который способен, при определенных условиях, индуцировать гемолиз эритроцитов. Механизм и граничные условия возникновения гемолитического эффекта Б-ТНКЖ подробно изучены экспериментально и подтверждены путем кинетического моделирования.

Второй вид взаимодействия Б-ТНКЖ с эритроцитами, обнаруженный в данной работе заключается в связывании части молекул комплекса с эритроцитами с образованием в системе двух равновесных пулов комплекса - свободного и связанного с мембраной. При этом на силу связывания, а следовательно, и на их способность быть донором NO влияет уровень липофильности S-лигандов, входящих в состав донора. Учет этого фактора, по заключению автора, позволит прогнозировать фармакологическую активность Б-ТНКЖ и при необходимости оптимизировать их структуру с учетом конкретного объекта фармакологического воздействия.

В целом изложенный в работе обширный экспериментальный материал демонстрирует большой объем проведенных автором исследований, а глубокое и всестороннее обсуждение полученных результатов на основе современных представлений о механизмах действия оксида азота на биологические системы обеспечивает в целом доказательное и непротиворечивое объяснение наблюдаемых эффектов. При этом результаты важнейших экспериментов, на основе которых впоследствии делались основные выводы, были смоделированы и подтверждены

независимыми теоретическими методами. Все это в совокупности обеспечивает высокую степень достоверности полученным в работе результатам и сформулированным на их основе научным положениям и выводам. В конце работы сформулированы выводы и представлен список литературы.

В работе представлен достаточно большой объем материала, положения, выносимые на защиту, отражают главные результаты работы. Работа написана достаточно хорошим научным языком, отдельные небольшие замечания будут указаны ниже.

Автореферат диссертации адекватно отражает суть и основное содержание работы. Все основные результаты диссертации опубликованы в отечественных и зарубежных научных изданиях. По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, из них 3 - в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, 9 - в других журналах, сборниках статей и трудах конференций, 7 - в сборниках тезисов конференций.

### **Замечания и недостатки работы**

Считаю необходимым также сделать замечания и указать на некоторые недостатки данной диссертационной работы. Принципиальных замечаний к работе я не имею. Тем не менее, в разделе «Обзор литературы» на основании обсуждения литературных данных автору следовало бы сделать постановку задачи собственных исследований автора с обоснованием основных направлений диссертационной работы. Далее, в диссертации нет никакой информации о форме представления экспериментальных данных и об их статистической обработке, а величины экспериментальной ошибки указаны только в таблице 4.3.1, а на рисунках они отсутствуют. Считаю, что автору следовало бы в разделе «Материалы и методы» указать использованные в работе методы статистической обработки данных, кратность повторения опытов, а на рисунках привести значения экспериментальных ошибок, поскольку эти величины дают информацию о воспроизводимости данных и достоверности эффектов.

Далее, при изложении собственных результатов автор много внимания уделяет анализу процессов гемолиза эритроцитов при взаимодействии их с исследуемыми донорами NO, приводя при этом данные о механизмах действия молекул NO, инициирующих данный процесс. Учитывая то, что в суспензии эритроцитов в данных экспериментальных условиях выделяется не только оксид азота, но и другие продукты распада исследуемых доноров NO, то для однозначного подтверждения того, что именно свободный NO вызывает исследуемое повреждение эритроцитов, автору следовало бы выполнить контроль на действие самого NO в суспензии, например, регистрировать гемолиз, вводя в суспензию эритроцитов в стандартных условиях только продукты распада исследуемых комплексов (без свободного NO), а в других опытах вводя в эту суспензию только газообразный NO. Далее, автору при изложении собственных результатов следовало бы обосновать выбор значений концентраций всех используемых доноров NO. Кроме того, термин «NO-донирующий», часто используемый автором данной работы, считаю не очень удачным, который лучше было бы заменить на термины «донор NO» или «источник NO».

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, и скорее имеют характер рекомендаций.

### Заключение

Считаю, что по своему объему, содержанию, и значимости полученных результатов диссертационная работа Е.М.Соколовой «Кинетические закономерности и физико-химические механизмы взаимодействия биядерных тетранитрозильных комплексов железа – доноров оксида азота с эритроцитами» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решается актуальная научная задача в области биофизики. Данная работа отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Е.М.Соколова, заслуживает присвоения ей искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории физико - химических  
методов исследования  
НИИ экспериментальной кардиологии  
ФГБУ "Российский кардиологический  
научно-производственный комплекс"  
Минздрава России,  
доктор биологических наук



Тимошин  
Александр  
Анатольевич

Подпись в.н.с., д.б.н. А.А.Тимошина заверяю  
Учёный секретарь  
НИИ экспериментальной кардиологии  
ФГБУ "РКНПК" Минздрава России



С.А.Левашова

06 сентября 2016 г

Организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский кардиологический научно-производственный комплекс"  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: ул. 3-я Черепковская, 15А, Москва 121552, Россия

Телефон: +7(495)4147254

Факс: +7(495)4146699

E-mail: timoshin\_a\_a@mail.ru