



**УТВЕРЖДАЮ**  
И. о директора ИПХФ РАН  
профессор, д.ф.-м.н. И. В. Ломоносов

сентября 2021 года

## ОТЗЫВ

**ведущей организации на диссертацию Ромодина Леонида Александровича «Корректное применение хинолизидиновых производных кумарина для изучения комплекса цитохрома с с кардиолипином», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 - биофизика**

Свечение, сопровождающее многие химические, в первую очередь, свободнорадикальные реакции, получило общее название хемилюминесценции. В биологических системах собственная хемилюминесценция обычно обладает крайне низкой интенсивностью и требует для своего обнаружения и регистрации высокочувствительных фотоумножителей. Революционную роль сыграло обнаружение веществ, способных многократно усиливать собственную хемилюминесценцию, получивших название активаторов хемилюминесценции. В отличие от собственной люминесценции биосистемы, свечение, регистрируемое в присутствии активаторов, получило название активируемой хемилюминесценции. Метод активированной хемилюминесценции позволяет количественно оценивать интенсивность протекания свободнорадикальных процессов в биосистемах, что обусловило его многообразное использование в биофизических исследованиях. В качестве физических активаторов, усиливающих слабое свечение, возникающее при рекомбинации свободных радикалов, широкое применение нашли хинолизидиновые производные кумарина, известные в научной литературе под названиями кумарин 314, кумарин 334 и кумарин 525. Термин физический активатор, применяемый в отношении кумаринов, подчеркивает, что они не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, порождающих собственное свечение исследуемой биосистемы. Их действие основано на физическом переносе энергии с возбужденного продукта собственной хемилюминесцентной реакции на активатор. При этом эффект усиления свечения (для кумаринов на три порядка и более) достигается за счет высокого квантового выхода хемилюминесценции, присущего молекуле активатора.

Люминесцентные методы с использованием кумаринов в качестве активаторов хемилюминесценции широко применяются в настоящее время для наблюдения процессов как спонтанного, так и инициированного пероксидного окисления липидов (ПОЛ). К настоящему времени разработан ряд модельных систем, в которых тем или иным способом индуцируется ПОЛ. Одной из таких систем является комплекс цитохрома *c* с глицеролипидом кардиолипином. Под влиянием кардиолипина в белковой части цитохрома *c* происходят структурная перестройка, придающая цитохрому *c* не свойственную ему в норме пероксидазную активность. А именно, цитохром приобретает способность к двухэлектронному восстановлению пероксида водорода с образованием сверхокисленной формы железопорфирина со степенью окисления железа +4 и катион-радикалом на одном из атомов углерода порфиринового цикла - оксоферрил-порфирин-катион-радикала ( $\text{porphyrin}^{+\bullet}-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ). Эта форма железопорфирина, аналогична т.н. соединению I (compound I) в цикле пероксидазы. Обладая высокой окислительной способностью, она выступает в качестве непосредственного инициатора ПОЛ в системе цитохром *c* – кардиолипин.

Исследуя люминесценцию системы цитохром *c* – кардиолипин с использованием кумариновых производных в качестве активаторов, автор рассматриваемой работы, Л.А. Ромодин, впервые обнаружил, что кумариновые производные частично расходуются в ходе эксперимента. С учетом того, что физический активатор люминесценции действует по принципу линейного усилителя, его расходование должно очевидным образом приводить к искусственно заниженным значениям амплитуды спектра люминесценции. Оценить значимость возникающих искажений для интерпретации результатов научного эксперимента и найти способы их адекватной коррекции - было основной целью данной работы. Это определяет ее **актуальность** и потенциальную **практическую значимость**.

Диссертационная работа Л.А. Ромодина изложена на 184 страницах формата А4, содержит 39 рисунков и две таблицы и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (Глава 2), изложения результатов экспериментов (Глава 3), обсуждения результатов (Глава 4), заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 459 наименований.

**Глава 1** (обзор литературы) занимает 33 страницы, состоит из 5 разделов с внутренним делением на подразделы, т. е. хорошо структурирован. Обзор исчерпывающим образом охватывает проблематику исследований автора и



адекватно отражает современный уровень научных исследований в соответствующих областях.

В **Главе 2** представлены все используемые автором инструментальные методы, подробно описаны биохимические методики, а также приемы и методы анализа и статистической обработки экспериментальных результатов.

**Глава 3** содержит результаты собственных исследований автора. В основу методологии исследований автором был положен кинетический подход, обеспечивающий синхронизацию химических изменений в исследуемом образце, регистрируемых спектрофотометрически, с физическим откликом системы в виде активированной хемилюминесценции. Это подход является существенным элементом научной новизны данной работы. Спектрофотометрический анализ проводился путем записи спектров поглощения с их последующим количественным анализом в двух областях спектра: спектральный максимум полосы Соре цитохрома *c* (409 нм) и спектральный максимум соответствующего производного кумарина (447,5 либо 460 нм). В большинстве экспериментов в присутствии перекиси водорода наблюдалось снижение во времени оптического поглощения в области обоих указанных максимумов. Снижение интенсивности полосы Соре отражает, как полагает автор, разрушение порфиринового цикла цитохрома под действием пероксида водорода, с чем можно согласиться. Одновременно наблюдающееся снижение поглощения в области спектрального максимума кумарина означает, очевидно, его химическое превращение в результате взаимодействия с химическими компонентами системы. Используя коэффициенты экстинкции кумаринов и цитохрома *c* для двух указанных точек спектра, автор решает систему двух уравнений Ламберта-Бэра, определяя концентрации всех компонентов в ряде временных точек. Это позволило получить кинетические зависимости расходования кумарина исследуемых системах. Далее автор на основе ряда соображений приходит к выводу, что расходование кумарина в его экспериментальных условиях происходит по механизму псевдопервого порядка, что дает основание обработать экспериментальные кривые расходования кумаринов по уравнению необратимой химической реакции первого порядка и определить константы скорости. Опираясь на константу скорости, позволяющую оценить значение текущей доли активатора хемилюминесценции от его первоначального количества в системе, автор предложил корректировать экспериментальные спектры люминесценции с помощью

поправочной функции, учитывающей степень расходования активатора в данный момент времени. Это положение является основным результатом работы.

**Глава 4** полностью посвящена обсуждению экспериментальных результатов. В ней автор вновь возвращается к каждому из выполненных им экспериментов, подробно обсуждая как их инструментальное исполнение, так и используемые для анализа экспериментальных данных теоретические модели, подробно останавливаясь, в частности, на обосновании корректности принимаемых допущений.

В целом методическая постановка исследований и анализ кинетических закономерностей трансформации системы цитохром *c* - кардиолипидов в присутствии хинолизилиновых производных кумарина заслуживает высокой оценки. Разработанные автором подходы, позволяющие корректировать данные хемиллюминесцентного эксперимента, **практически значимы** и будут, безусловно, полезны в научных исследованиях пероксидного окисления липидов методом активированной хемиллюминесценции специалистами, работающими в области биофизики, химической и биохимической физики, таких организаций как: Институт проблем химической физики РАН, Институт биохимической физики, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Результаты можно также рекомендовать для включения в спецкурсы для бакалавров и магистров, обучающихся по направлению «Биофизика» и «Биохимическая физика».

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений. Исследования проведены с использованием современного оборудования, кинетические результаты получены со статистической ошибкой, приемлемой в кинетических экспериментах, и обработаны с использованием известных теоретических подходов и моделей, творчески адаптированных автором для изучаемой им системы.

Результаты работы прошли апробацию в виде 5 научных публикаций в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК для публикации научных результатов диссертационных исследований, было сделано 10 устных докладов на научных конференциях разного уровня.

Содержание автореферата соответствует основному содержанию диссертации.

Несмотря на положительную оценку данной работы в целом, хотелось бы отметить три момента в качестве замечаний.



1. Обозначение Соединения I (compound 1) как «ферриформы цитохрома с с двумя окисленными эквивалентами» выглядит не вполне удачным. Во-первых, это не название самой этой структуры, а лишь указание на компонент, из которого она образуется. Кроме того, обычно в химической литературе принято говорить о восстановительных эквивалентах, подразумевая под этим материальную частицу, электрон (или атом водорода), передающуюся в окислительно-восстановительной реакции. Термина «окисленный эквивалент» не существует, так как это лишено физического смысла. Допустимо сказать «окисляющий эквивалент (oxidizing equivalent)», имея в виду, потенциальную способность окислителя принять один электрон. По нашему мнению компаунд 1 можно было бы называть «оксоферрил-порфириин-катион-радикал», что хорошо соотносится с сокращенным обозначением, используемом на рисунках в диссертации:  $\text{porphyrin}^{+\bullet}-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ .

2. Автор утверждает, что константы скорости разрушения кумариновых производных были им вычислены. Однако, процедура этого «вычисления» нигде не приводится. Если это была аппроксимация по экспериментальным точкам, то желательно было бы показать графики такой аппроксимации, а также определить средние ошибки аппроксимации. По этим данным можно было бы судить о согласии экспериментальной кинетической кривой с моделью первого порядка, которая принята автором в виде допущения.

3. В конце раздела 3.1 автореферата (стр.14) приводится таблица без подписи к ней. Такой таблицы в диссертации нет вообще. Данные, содержащиеся в ней, приводятся в разных местах в виде текста (стр. 77, 111-112).

Сделанные выше замечания не относятся к критическим недостаткам, оказывающим существенное влияние на выводы диссертации, либо ставящим под сомнения положения, выносимые автором на защиту.

Диссертационная работа Л.А. Ромодина «Корректное применение хинолизидиновых производных кумарина для изучения комплекса цитохрома с с кардиолипином», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена важная научно-практическая задача – изучены особенности использования хинолизидиновых производных кумарина в качестве активаторов хемиллюминесценции в модельной системе пероксидного окисления, индуцируемого комплексом цитохром с - кардиолипин и

предложены способы корректировки хемоллюминограмм, учитывающие расходование кумаринового активатора люминесценции в ходе опыта.

По своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне и научно-практической значимости работа Л.А. Ромодина соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 №426, с изм., внесенными Решением Верховного Суда РФ от 21.04.2014 № АКПИ14-115, постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 № 751), ее автор, **Ромодин Леонид Александрович** заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – биофизика.

Отзыв подготовлен старшим научным сотрудником, к.б.н. Н.И. Нешевым и одобрен на заседании Ученого совета Отдела кинетики химических и биологических процессов ИПХФ РАН, протокол №...12.. от 08 сентября 2021 г.

Старший научный сотрудник, к.б.н

Н.И. Нешев

Председатель  
Зав Отделом кинетики химических и биологических процессов  
ИПХФ РАН, к.б.н.

А.А. Терентьев

Секретарь с.н.с., к.б.н.

А.А. Балакина

Контактная информация:

Федеральное государственное учреждение науки

Институт проблем химической физики РАН

Тел. (49652)27779, (49652)21698.

E-mail: [alexei@icp.ac.ru](mailto:alexei@icp.ac.ru); [neshev@icp.ac.ru](mailto:neshev@icp.ac.ru)

Почтовый адрес: 142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр.акад. Семенова, д.1

Личные подписи Н.И. Нешева, А.А. Терентьева, А.А. Балакиной – **удостоверяю**

Ученый секретарь ИПХФ РАН



д.х.н. Б.Л. Психа

### Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт проблем химической физики Российской академии наук»

Адрес: пр. академика Семенова, 1, г. Черноголовка, Московская обл., 142432, Россия

Телефон: +7(495) 993-57-07

Эл. почта: office@icp.ac.ru

Сайт: <https://www.icp.ac.ru/ru/>

### Список публикаций сотрудников отдела кинетики химических и биологических процессов ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН» (2017 – 2021 гг.) по теме диссертации Ромодина Л.А.

1. Покидова О.В., Шкондина Н.И., Руднева Т.Н., Котельников А.И., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Алдошин С.М. Изучение распада нитрозильного комплекса железа типа  $\mu$ -N-C-S и его взаимодействие с GSH в водном растворе // Доклады Академии наук. 2017. Т. 473, № 2, С.173-176
2. Нешев Н.И., Соколова Е.М., Козуб Г.И., Кондратьева Т.А., Санина Н.А. NO-донирующая и гемолитическая активность тетранитрозильных комплексов железа с лигандами ряда 2-меркаптопиридина // Известия Академии наук. Серия химическая. 2017. № 8, С. 1510-1514
3. Покидова О.В., Емельянова Н.С., Шкондина Н.И., Котельников А.И., Сырцова Л.А., Санина Н.А., Алдошин С.М. Особенности разложения нейтральных нитрозильных комплексов железа с арилсодержащими тиолатными лигандами в различных средах. Взаимодействие с глутатионом // Известия Академии наук. Серия химическая. 2017.- № 5, С. 821-827
4. Тихонов И.В., Плисс Е.М., Бородин Л.И., Сень В. Супероксидные радикалы в кинетике ингибированного нитроксильными радикалами окисления метиллинолеата в мицеллах // Химическая физика. 2017. Т. 36, С. 20-23
5. Sen' V.D., Sokolova E.M., Neshev N.I., Kulikov A.V., Pliss E.M. Low molecular chitosan-(poly) nitroxides: Synthesis and evaluation as antioxidants on free radical-induced erythrocyte hemolysis // Reactive and Functional Polymers. 2017. V. 111, PP. 53-59
6. Мумятова В.А., Балакина А.А., Сень В.Д., Плисс Е.М., Терентьев А.А. Влияние хитозан-полинитроксидов на нормальные и опухолевые клетки в условиях индуцированного окислительного стресса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 166, № 12, С. 747-753
7. Балакина А.А., Мумятова В.А., Плисс Е.М., Терентьев А.А., Сень В.Д. Антиоксидантные свойства хитозан-полинитроксидов при инициированном

- окислительном стрессе // Известия Академии наук. Серия химическая. 2018. № 11, С. 2135-2140
8. Poletaeva D.A., Faingold I.I., Soldatova Y.V., Smolina A.V., Fedorov, B.S., Ereemeev A.B., Kotelnikova R.A. Membranotropic and Antiradical Properties of 2-Nitroxysuccinate 3-Hydroxy-6-Methyl-2-Ethylpyridine. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2019. V. 167, N 6, P. 744-746.
  9. Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Смолина А.В., Полетаева Д.А., Солдатова Ю.В., Покидова О.В., Садков А.П., Санина Н.А., Алдошин С.М. Антиоксидантная активность тетранитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами и его влияние на каталитическую активность митохондриальных ферментов в опытах *in vitro*. // Доклады Академии Наук (биохимия, биофизика, молекулярная биология). 2019. Т. 488, № 5, С. 571-575.
  10. Balakina A.A., Raevskaya T.A., Pavlov V.S., Mumyatova V.A., Goncharova S.A., Terent'ev A.A. Activity of antioxidant enzymes and content of reduced glutathione in cells of drug-resistant murine leukemia P388 strains // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2019. V. 167, Iss. 3, P. 339-342
  11. Krapivin V. B., Sen' V.D., Luzhkov V. B. Quantum chemical calculations of the one-electron oxidation potential of nitroxide spin labels in biologically active compounds // Chem. Phys. 2019. V. 522, P. 214–219.
  12. Мумятова В.А., Балакина А.А., Лапшина М.А., Сень В.Д., Корнев А.Б., Терентьев А.А. Влияние функционирования опухолевого супрессора p53 на экспрессию генов антиоксидантной системы при действии цитотоксических соединений // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2020. № 1. С. 54-61.
  13. Психа Б.Л., Нешев Н.И., Соколова Е.М., Санина Н.А. Кинетическое моделирование процесса взаимодействия доноров оксида азота с эритроцитами. // Химическая физика. 2020. Т. 39. №7. С. 9-16. DOI: 10.31857/S0207401X20070109.
  14. Lapshina M., Ustyugov A., Baulin V., Terentiev A., Tsivadze A., Goldshleger N. Crown- and phosphoryl-containing metal phthalocyanines in solutions of poly(N-vinylpyrrolidone): supramolecular organization, accumulation in cells, photo-induced generation of reactive oxygen species, and cytotoxicity // Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology. 2020. V. 2020. P. 111722. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111722
  15. Emel'yanova N. S., Gutsev L. G., Pokidova O. V., Shestakov A. F., Sanina N. A., Aldoshin S. M. Investigation of the interaction of the cationic nitrosyl iron complex  $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2]^+$  with molecular oxygen. *Inorganica Chimica Acta*, 2021, 522, 120361.