

ОТЗЫВ

официального оппонента,

доктора медицинских наук, профессора Узбекиова Марата Галиевича,

на диссертацию

Ромодина Леонида Александровича

«КОРРЕКТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ХИНОЛИЗИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
КУМАРИНА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ЦИТОХРОМА *c c*

КАРДИОЛИПИНОМ»,

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности - 1.5.2. Биофизика

Актуальность темы.

Метод регистрации хемилюминесценции является единственным методом, позволяющим изучать свободнорадикальные реакции, в т.ч. реакции перекисного окисления липидов, в образце в «режиме реального времени». Данный метод позволяет оценивать скорость реакции образования свободных радикалов. Однако по причине крайне низкой интенсивности этого свечения в подавляющем большинстве исследований приходится использовать специальные люминесцирующие реагенты, называемые в большинстве отечественных работ «активаторами хемилюминесценции». Эти вещества перехватывают энергию электронного возбуждения от возбуждённых продуктов свободнорадикальной реакции и впоследствии выделяют её в виде фотонов. При этом квантовый выход люминесценции возбуждённых молекул активаторов выше, нежели у возбуждённых молекул продуктов свободнорадикальных реакций. Поэтому внесение в образец активаторов приводит к увеличению интенсивности свечения пробы. Однако применение активаторов хемилюминесценции сопряжено с рядом трудностей, главная из которых – возможное снижение их концентрации в процессе изучаемой реакции. Оно приводит к снижению интенсивности хемилюминесценции, что может быть ложно интерпретировано как результат снижения интенсивности свободнорадикального процесса в пробе, а это, в свою очередь, ведёт за собой неверную интерпретацию экспериментальных данных. Именно это и имеет место при изучении функций комплекса цитохрома *c c* с кардиолипином при использовании в качестве активаторов хемилюминесценции хинолизидиновых производных кумарина. Так как комплекс цитохрома *c c* с кардиолипином играет ключевую роль при запуске апоптоза по митохондриальному пути, изыскание корректных способов его изучения чрезвычайно важно для дальнейших исследований свойств данной

супрамолекулярной структуры и поиска способов использовать эти свойства в терапии и для профилактики различных патологий.

Новизна исследования и полученных результатов.

В работе проведено систематическое исследование свойств хинолизидиновых производных кумарина в системе, в которой протекают пероксидазная, липопероксидазная и квазилипоксигеназная ферментативные реакции, катализируемые факультативной пероксидазой, в роли которой в обсуждаемом исследовании выступал цитохром *c*, связанный с кардиолипином. Определены константы скорости разрушения производных кумарина в процессе катализируемых комплексом цитохрома *c* с кардиолипином пероксидазной и липопероксидазной реакций. На их основе выведены функции вычисления поправочных коэффициентов для придания хемиллюминесцентным кривым такого вида, какой они имели бы при неизменной концентрации производных кумарина в системе. На основании сравнения данных касательно изменения концентрации производных кумарина в процессе липопероксидазной и квазилипоксигеназной реакций автором диссертации определено, что производные кумарина в каталитическом пероксидажном цикле занимают место восстанавливающего субстрата формы феррицитохрома *c* с двумя окисленными эквивалентами, называемой в литературных источниках компаундом 1, а квазилипоксигеназный каталитический цикл протекает посредством не дву-, а только одноэлектронного окисления ферриформы пероксидазы с последующим восстановлением. В ходе работы автором были получены данные о различии действия тролокса и дигидрокверцетина на запускаемую комплексом цитохрома *c* с кардиолипином липидную пероксидацию, а также о том, что препараты на основе хлорофилла обладают свойством ингибировать процессы перекисного окисления липидов. А обусловленное этим подавление метаболизма липидных радиотоксинов, таким образом, является важной частью показанного ранее радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные Ромодиным Л.А. в работе, основаны на изучении достаточного объёма экспериментального материала. Автором были использованы современные методы исследования, полностью соответствующие поставленным задачам, а

экспериментальные данные подвергнуты статистической обработке. Выводы диссертации аргументированы и соответствуют проведённым исследованиям.

Достоверность результатов и выводов.

Достоверность изложенных в диссертации Ромодина Л.А. данных подтверждается воспроизводимостью результатов экспериментальных измерений и их статистической обработкой.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные результаты позволяют глубже понять свойства комплекса цитохрома *c* с кардиолипином благодаря использованию предложенных автором адекватных методов проведения опытов и обработки экспериментальных данных, полученных методом усиленной производными кумарина хемиллюминесценции. Корректирующие функции позволяют придать хемиллюминограммам вид, будто бы концентрация активатора хемиллюминесценции не меняется в процессе реакции. Благодаря этому хемиллюминесцентная кривая будет отражать реальную кинетику процесса перекисного окисления липидов в образце, вследствие чего станет возможным получение достоверных сведений, например, о свойствах антиоксидантов в свете подавления ферментативной липидной пероксидации. Также представляется весьма интересной предложенная автором модель действия ионизирующего излучения на липиды, заключающаяся во внесении в образец фермента - пероксидазы, катализирующего квазилипноксигеназную реакцию, за счёт которой в образце запускается процесс перекисного окисления липидов, аналогичный имеющему место при действии на организм ионизирующего излучения. Благодаря использованию данной модели, автором было обнаружено подавление процесса перекисного окисления липидов под действием водорастворимой формы хлорофилла – хлорофиллина. Данное открытие проливает свет на ранее показанный механизм радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла. А определённое автором работы значение концентрации хлорофиллина, при которой наблюдается половинное угнетение липидной пероксидации, позволит в будущих исследованиях рассчитать терапевтические дозы препаратов на основе хлорофилла для их использования как в качестве радиопротекторов, так и, в целом, средств подавления окислительного стресса, лежащего в основе развития многих патологий.

Содержание диссертации, её завершённость, оформление

Диссертация изложена на 184 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и экспериментальных методик, изложения результатов экспериментов, их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы, содержащего 459 источников, в том числе 145 отечественных и 314 зарубежных.

Раздел «Введение» содержит описание актуальности работы, обоснование цели, поставленных задач, а также изложение практической и теоретической значимости работы, сведения о её апробации, в т.ч. – об устных выступлениях автора работа с докладами на 11 научных конференциях.

В разделе «Обзор литературы» отражено современное состояние исследований в изучаемой диссертантом области, обсуждены все важные вопросы, имеющие отношение к теме диссертации. Автор использовал большое количество новейших источников,

В разделе «Материалы и методы» описаны методы исследований. Автором применены современные методы исследований и способы обсчета полученных результатов. Автором разработан метод спектрофотометрического исследования изучаемых проб. Также был применен метод изучения хемилюминесценции.

В разделе «Результаты» представлены данные об оптических свойствах цитохрома *c* и изучаемых в работе хинолизидиновых производных кумарина. Показана обратимость действия метанола на железо-серную связь в молекуле цитохрома *c*, разрыв которой приводит к появлению пероксидазной активности у данного белка. Подтверждена обусловленность хемилюминесценции системы цитохром *c* – кардиолипид ферментативной активностью цитохрома *c*. Доказано, что производные кумарина являются восстанавливающими субстратами цитохрома *c*, катализирующего пероксидазную и липопероксидазную реакцию, и что данные вещества не расходуются в процессе катализируемой им квазилипоксигеназной реакции. В этом разделе приводятся результаты исследования методом регистрации усиленной coumarin-334 хемилюминесценции подавления дигидрокверцетином и тролоксом катализируемой комплексом цитохромасс кардиолипином липопероксидазной реакции. Показано, что тролокс, в отличие от дигидрокверцетина, не вызывает подавления липидной пероксидации на протяжении всего измерения, а задерживает её развитие на

определённое время. Данные, представленные автором на рисунке 29, на котором сравниваются хемилюминесцентные кривые, непосредственно зарегистрированные хемилюминометром и откорректированные поправочными на снижение концентрации coumarin-334 функциями, наглядно иллюстрируют необходимость применения поправочных на снижение концентрации активатора хемилюминесценции коэффициентов при обработке результатов хемилюминесцентных исследований. Также в обсуждаемом разделе приведены результаты исследования, доказывающие способность хлорофиллина подавлять процессы перекисного окисления липидов.

В разделе «Обсуждение результатов» автор интерпретировал результаты выполненной работы и провёл сравнительный анализ собственных данных с результатами исследований отечественных и зарубежных учёных. В данном разделе Ромодин Л.А. подробно и логично обосновал положения диссертации. Например, именно здесь выдвинуто предположение о том, что производные кумарина являются восстанавливающими субстратами формы феррицитохрома *c* с двумя окисленными эквивалентами и что в квазилипоксигеназном каталитическом цикле данная форма пероксидазы отсутствует. В данном разделе автор приводит значения констант скорости разрушения производных кумарина в процессе ферментативной липопероксидазной и пероксидазной реакций и предлагает конкретные математические функции для корректировки хемилюминесцентных кривых. Также Ромодин Л.А. сформулировал предположение о конкретном механизме радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла, проиллюстрированное рисунком 39, и предлагает рекомендации в направлении дальнейших исследований радиозащитных свойств препаратов на основе хлорофилла.

Итоги диссертации подводятся в разделах «Заключение» и «Выводы». Они хорошо обоснованы и напрямую вытекают из содержания диссертации, написаны логично и последовательно.

Замечания к работе

К диссертации имеется ряд замечаний. Так:

- 1) В обзоре литературы упоминается роль белка p53 и белков семейства Bcl-2 в развитии апоптоза. Считаю это излишним, так как диссертация посвящена методам изучения комплекса цитохрома *c* с кардиолипином.
- 2) Имеется некоторая несогласованность в подписях к рисункам и врезкам между текстами диссертации и автореферата.

Однако эти замечания не носят принципиального характера и не снижают общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

Заключение

Учитывая всё вышесказанное, считаю, что диссертация Ромодина Леонида Александровича на тему «Корректное применение хинолизидиновых производных кумарина для изучения комплекса цитохрома *c* с кардиолипином», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика, представляет собой самостоятельно проведенное и законченное научное исследование. Совокупность полученных автором достоверных научных данных, выводов и рекомендаций дают основание считать рецензируемую диссертацию важной научно-квалификационной работой, в которой решена крупная научная проблема, имеющая существенное значение как для биофизики, так и для медицины.

Считаю, что диссертационная работа полностью соответствует п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», а её автор, Ромодин Леонид Александрович, несомненно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Руководитель лаборатории патологии мозга
Московского НИИ психиатрии – филиала
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр психиатрии и наркологии
имени В.П. Сербского» Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор

Узбеков М.Г.

26 августа 2021 г.

Подпись профессора Узбекова М.Г. заверяю
Ученый секретарь НМИЦ ПН им. В.П. Сербского МЗ РФ
кандидат медицинских наук



Шпорт С.В.

Московский НИИ психиатрии – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, 107076, г. Москва, ул. Потешная, д. 3, к. 10
8(495)963-76 - 26; info@serbsky.ru

Сведения об оппоненте

УЗБЕКОВ Марат Галиевич

Учёная степень, звание: Доктор медицинских наук
(специальность 03.01.04 Биохимия), профессор

Место работы: Московский научно-исследовательский институт психиатрии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, лаборатория патологии мозга

Должность: заведующий лабораторией

Адрес организации: 107076, г. Москва, ул. Потешная, д. 3, к. 10

Адрес эл. почты организации: info@serbsky.ru

Телефон: 8(495)963-71-12

Сайт организации: <http://mniip.serbsky.ru>

Научные публикации ведущего оппонента по тематике диссертационного исследования Ромодина Л.А. за последние пять лет (2017–2021 гг.):

1. Узбеков М.Г, Сырейщикова Т.И, Максимова Н.М, Смолина Н.В, Добрецов Г.Е., Бриллиантова В.В., Шихов С.Н. Конформационные изменения молекулы альбумина сыворотки крови у больных тревожной депрессией // Социальная и клиническая психиатрия. 2020, 30 (3), 13-16.
2. Uzbekov M, Brilliantova V., Shikhov S. Monoamine Oxidase and Semi-Carbazide Sensitive Amine Oxidase in Pathogenetic Mechanisms of First Episode of Schizophrenia // Biomedical Journal of Scientific and Technical Research, 2019, V. 23, No 1, p. 17167-17169
3. Syrejshchikova T.I., Syromyatnikova E.D., Smolina N.V., Brilliantova V.V., Uzbekov M.G., Dobretsov G.E. Time-resolved tryptophan fluorescence as an indicator of alteration in serum proteins in melancholic depression // Biophysics, 2019, V.64 (1), pp. 95-99.
4. Узбеков М.Г. Эндогенная интоксикация и ее роль в патогенетических механизмах психических расстройств // Социальная и Клиническая Психиатрия, 2019, Т. 29, № 3, с. 14-20
5. Сырейщикова Т.И., Смолина Н.В., Бриллиантова В.В., Сыромятникова Е.Д., Узбеков М.Г., Добрецов Г.Е. Триптофановая флуоресценция с временным разрешением как индикатор изменений белков плазмы крови при меланхолической депрессии // Биофизика, 2019, Т. 64, № 1, с. 115 – 120
6. Uzbekov M., Syrejshchikova T., Smolina N., Maximova N., Shikhov S., Brilliantova V. Antidepressant Therapy has Restored Albumin Conformation in Anxious Depression // Biomedical Journal of Scientific and Technical Research, 2019, V 21, No 4, p. 16103 – 16105
7. Uzbekov M., Olisova O., Maximov I., Shikhov S., Novoselov V., Ignat'ev D. Psoriasis is followed by increased level of endogenous intoxication // Biomedical Journal of Scientific and Technical Research, 2019, V. 20, No 5, p. 15358-15359

8. Uzbekov M., Syrejshchikova T., Smolina N., Syromyatnikova E., Brilliantova V., Dobretsov G. Time resolved tryptophan fluorescence as a new approach for investigation of serum albumin disturbances in melancholic depression // *European Psychiatry*, 2019, V. 565, P. S532.
9. Uzbekov M., Brilliantova V., Smolina N., Shikhov S., Dobretsov G., Strelkova I., Syrejshchikova T. First episode of schizophrenia is followed by disturbances in serum albumin antioxidant function // *European Psychiatry*, 2019, V. 565, P. S726.
10. Uzbekov M., Babushkina T., Klimova T., Peregudov A., Syrejshchikova T., Smolina N., Brilliantova V., Dobretsov G. Nuclear magnetic resonance spectroscopy has revealed serum albumin conformational disturbances in patients with first episode of schizophrenia. // *European Psychiatry*, 2019, V. 565, P. S836.
11. Uzbekov M., Alferova V, Shikhov S, Mayorova L, Kuptsova S, Petrushevsky A, Strelkova I. Increased platelet monoamine oxidase activity in patients on acute stage of ischemic insult as a potential biomarker of a better functional outcome of the illness // *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research (BJSTR)*, 2019, V. 17, No 4, p.1-3. DOI: 10.26717/BJSTR.2019.17.003047
12. Uzbekov M., Babushkina T., Klimova T., Peregudov A., Syrejshchikova T., Smolina N., Brilliantova V., Dobretsov G., Shikhov S. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of serum albumin in first episode drug-naïve schizophrenic patients // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 2019, V. 15, No 3, P. 1-3
13. Uzbekov M., Brilliantova V., Shikhov S., Syrejshchikova T., Dobretsov G., Maximova N. First episode of schizophrenia: potential biomarkers of pharmacotherapy efficacy // *European Neuropsychopharmacology*, 2019, V. 29 (Suppl 1), P. S96-S97.
14. Uzbekov M, Syrejshchikova T, Smolina N, Syromyatnikova E, Brilliantova V and Dobretsov G. Serum Albumin Conformational Disturbances in Melancholic Depression can be Revealed Using Time Resolved Tryptophan Fluorescence // *Biomedical J Sci Tech Res*, 2018, V. 12 (1), P. 1-2 DOI: 10.26717/BJSTR.2018.12.002197
15. Бриллиантова В.В, Смолина Н.В., Сырейщикова Т.И., Узбеков М.Г., Добрецов Г.Е. Состояние тиоловых групп альбумина у больных с первым эпизодом шизофрении // *Нейрохимия*, 2018, Т. 35, № 1, с. 96–100