

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Тимошина Александра Анатольевича о диссертационной работе Ткачева Николая Анатольевича на тему «Влияние динитрозильных комплексов железа на индуцированный эндометриоз у крыс», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.02 – биофизика и 03.01.04 – биохимия.

### **Актуальность темы**

Диссертационная работа Ткачева Н.А. по своей тематике находится на стыке биофизического, биохимического и медицинского аспектов исследования оксида азота и посвящена исследованию молекулярных механизмов действия динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) на модели экспериментального эндометриоза самок крыс. Актуальность данной темы определяется тем, что эндометриоз является широко распространённым и социально значимым заболеванием, единственным методом лечения которого до сих пор остаётся хирургический, сопряжённый с ненадёжной и дорогостоящей гормональной терапией. Это делает исключительно актуальной разработку новых нетравматических методов терапии данного заболевания. Применение ДНКЖ в данных условиях является весьма перспективным и удобным методом лекарственной терапии, поскольку эти комплексы являются природными нетоксичными соединениями, обладающими высокой биологической активностью, механизм действия которых ещё во многом неясен.

### **Цель и задачи работы**

Целью данной работы является изучение влияния динитрозильных комплексов железа с глутатионом на быстрорастущую ткань на примере модели эндометриоза у крыс, сравнение этого влияния с действием гормона ингибина, и оценка возможности применения этих комплексов для терапии эндометриоза.

В соответствии с целью исследования автором были поставлены и успешно решены следующие задачи:

1. оценить концентрацию эндогенных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) и оксида азота в органах и тканях крыс с модельным эндометриозом;
2. исследовать воздействие низкомолекулярных ДНКЖ с тиоловыми лигандами на течение экспериментального эндометриоза на разных стадиях;
3. определить количество восстановленных тиоловых групп в белке ингибине, для оценки степени его нативности и использования его в качестве гормонального лечебного средства;
4. исследовать воздействие гормона ингибина на течение экспериментального эндометриоза у крыс.

### **Научная новизна**

В диссертационной работе Ткачева Н.А. проведено комплексное исследование воздействия динитрозильного комплекса железа с глутатионом на очаги индуцированного эндометриоза с целью определения применимости этих комплексов для биомедицинских целей.

В первой части работы продемонстрировано угнетение эндометриоидных очагов под действием гормона ингибина. При этом поиск более эффективной и безопасной альтернативы современным гормональным препаратам для лечения

эндометриоза является одним из перспективных и активно развиваемых направлений в медицине.

Вторая часть работы посвящена анализу влияния динитрозильных комплексов железа с глутатионом на течение модельного эндометриоза. Показано, что развитие очагов угнетается ещё более эффективно, чем при введении ингибина, особенно на ранних стадия заболевания. Для объяснения предлагается сформированная на основе анализа данных литературы схема смещения баланса сигналов в эндометриоидной клетке, причём в работе предлагаются конкретные точки приложения для воздействия комплекса, такие как фактор транскрипции каппа В и ароматаза.

В заключительной части работы впервые проведен анализ структуры ингибина после разведения из лиофилизата. Показанный в работе эффект восстановления денатурированным ингибином нативной структуры после прогревания или смещения рН среды представляет интерес не только для данного белка, но и открывает перспективы выявления аналогичных свойств у других белковых молекул.

### **Научно-практическая значимость**

Полученные автором результаты вносят вклад в установление роли оксида азота и его производных в регуляции биохимических и физиологических процессов в норме и при патологии. Показано, что ДНКЖ специфически угнетает рост и вызывает гибель быстрорастущих очагов эндометриоза на модели целых животных.

### **Практическая значимость**

Результаты, полученные в данном исследовании, могут быть использованы для разработки новой стратегии терапии эндометриоза с использованием стабильных доноров оксида азота.

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

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов исследования, результатов экспериментов, обсуждения этих результатов, списка литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, иллюстративный материал включает 41 рисунок и 6 таблиц. Список литературы содержит 142 наименования, из них 121 англоязычных.

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

В литературном обзоре автор приводит данные о биологической роли монооксида азота и его производных, в особенности динитрозильных комплексов железа. Кроме того, в этом разделе представлены данные об эндометриозе, как широко распространённом заболевании, причём особое внимание автором уделяется биохимическим аспектам этого заболевания. Приведены данные о сигнальных путях, регулирующих метаболизм эндометриоидных очагов, а именно о семействе регуляторных факторов TGF $\beta$ , к которому принадлежит исследуемый гормон ингибин.

Обзор 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. Исходя из данного раздела диссертации следует, что работа выполнена на современном методическом уровне, причём экспериментальные подходы можно охарактеризовать, как адекватные поставленным задачам исследования.

Экспериментальная часть работы состоит из трех частей. В первой части проведено исследование воздействия гормона ингибина на развитие эндометриoidных очагов. Во второй части работы автором на модели экспериментального эндометриоза исследуется защитное действие динитрозильных комплексов железа с лигандом глутатионом.

В третьей части работы проведен анализ используемого в первой части работы препарата на предмет соответствия его структуры биологически активной форме белка. Для этого была определена способность белка в препарате образовывать моно- и динитрозильные комплексы железа. Как показал эксперимент, при определённых условиях белок способен восстанавливать нативную форму с четырьмя близко расположенными тиоловыми остатками, что следует из его способности образовывать моонитрозильный комплекс.

В заключении автор подводит итоги полученным результатам, подчеркивая важность и необходимость дальнейшего анализа роли динитрозильных комплексов железа как внутриклеточной сигнальной молекулы. Также отмечена перспективность разработки новых лекарственных средств на основе таких комплексов. В конце работы сформулированы выводы и представлен список литературы.

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне. В работе представлен достаточно большой объем материала, проведена качественная статистическая обработка, положения, выносимые на защиту, отражают главные результаты работы.

Автореферат диссертации адекватно отражает суть и основное содержание работы. Все основные результаты диссертации опубликованы в отечественных и зарубежных научных изданиях. По материалам диссертации автором опубликовано 12 печатных работ, в том числе 8 статей и 4 тезисов докладов на российских и международных конференциях. 5 статей опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК России для публикации результатов диссертационных исследований, и 2 статьи - в зарубежных научных журналах.

### **Замечания и недостатки работы**

Считаю необходимым также сделать замечания и представить и некоторые недостатки данной работы. Так, обзор литературы, сделанный автором, – достаточно подробный и носит компилятивный характер. Вместе с тем, изложение литературных данных практически не сопровождается критической оценкой автора. При этом также он не завершается постановкой задачи диссертации, а её цель и задачи сформулированы только во введении работы.

Далее, при изложении результатов исследования, эксперименты ставились главным образом на животных из двух экспериментальных групп, а именно контрольные крысы с экспериментальным эндометриозом, а также получавшие препараты для его лечения (ингибин, ДНКЖ). Считаю, что автору работы

следовало бы создать и третью экспериментальную группу, в которой использовать интактных животных без эндометриоза. В этом случае было бы удобно относительно этой группы демонстрировать эффекты, вызванные развитием эндометриоза, а также его лечения. В частности, именно по отношению к базальному уровню, автору было бы удобно регистрировать содержание разных форм NO в организме животных с эндометриозом, а также после его лечения.

Кроме того, в разделе 2.3.3 диссертационной работы в таблице 6 автором приводятся данные об уровне NO в крови и ткани органов животных из разных экспериментальных групп. По поводу этих данных считаю необходимым отметить следующее. Во-первых, автором не указано, концентрации каких форм NO представлены в таблице, - свободных NO или их стабилизированных комплексов. Во-вторых, регистрация содержания NO в органах, исходя из сигналов парамагнитных нитрозильных комплексов гемовых белков является не вполне корректным подходом, поскольку эти комплексы сравнительно нестабильны, они легко окисляются кислородом до нитратов, а содержание самих гемовых белков и кислорода может варьировать при переходе от одного органа к другому. Считаю, что эти данные нуждаются в уточнении с использованием стабильных спиновых ловушек, способных взаимодействовать избирательно со свободным NO в организме.

Все сделанные мною замечания не являются принципиальными, не ставят под сомнение основные результаты диссертационной работы и её выводы.

### **Заключение**

Считаю, что по своему объему, содержанию, и достоверности полученных результатов диссертационная работа Ткачева Н.А. «Влияние динитрозильных комплексов железа на индуцированный эндометриоз у крыс» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решается актуальная научная задача в области биофизики и биохимии. Данная работа отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Ткачев Н.А., заслуживает присвоения ему искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.02 – «биофизика» и 03.01.04 – «биохимия».

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

А.А.Тимошин

Подпись в.н.с., д.б.н. А.А.Тимошина заверяю:

Учёный секретарь

НИИ экспериментальной кардиологии  
ФГБУ "РКНПК" Минздрава России

С.А.Левашова

01 июня 2015 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](mailto:timoshin_a_a@mail.ru)