

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе

Николая Анатольевича Ткачева 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.

Оксид азота — один из основных внутриклеточных мессенджеров. «Горячей точкой» в исследовании механизмов действия оксида азота является химическая структура, в виде которой соединение транспортируется и участвует в регуляции физиологических процессов в клетке. Еще предстоит ответить на вопрос, может ли такое соединение быть свободной радикальной формой монооксида азота, нитрозотиолами, нитрозильными комплексами железа или нитритом. Диссертационная работа Н.А.Ткачева является развитием идеи А.Ф. Ванина об участии в клеточной регуляции димерных нитрозильных комплексов железа с тиоловыми лигандами (ДНКЖ) и их мономерных форм (М-ДНКЖ) как центрального звена передачи оксида азота в клетке. В качестве модели для изучения действия агониста TGF β -рецептора ингибина и ДНКЖ диссертант выбрал экспериментальный эндометриоз, а именно фрагменты ткани эндометрия, помещенные в брюшину и активно там пролиферирующие. Необходимо подчеркнуть, что эндометриоз является социально значимым заболеванием – каждая третья гинекологическая патология в России связана с этим заболеванием.

Таким образом, актуальность диссертационной работы неоспорима: автор не только изучил механизмы участия окиси азота в регуляции пролиферации эндометрия, но и предложил новый подход к лечению эндометриоза.

Научная новизна. В диссертационной работе Ткачева Н.А. впервые проведено комплексное исследование воздействия гормона ингибина, а также комплекса ДНКЖ с глутатионом на очаги индуцированного эндометриоза. Было показано, изученные соединения более эффективно, по сравнению с известными фармакологическими препаратами, тормозят развитие, вызывают деструкцию и рассасывание уже существующих эндометриоидных очагов. Следует отметить, что ДНКЖ более эффективно, чем ингибин угнетает развитие эндометриоидных очагов, особенно на ранних стадия заболевания. Для объяснения полученных эффектов автор предлагает схему смещения баланса сигналов в эндометриоидной клетке, что приводит в конечном итоге к ее гибели. Таким образом, результаты, представленные в диссертации, являются новыми и оригинальными.

Практическая значимость данной работы не вызывает сомнений. Данные, полученные в настоящем исследовании, могут быть использованы для разработки новых подходов в терапии эндометриоза с использованием стабильных доноров оксида азота.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов и 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 исследования, сформулированы цель и задачи работы, охарактеризованы научная новизна, а также практическая значимость полученных результатов.

В литературном обзоре автор подробно рассматривает имеющиеся на данный момент времени сведения о строении гормона ингибина и механизме передачи сигнала через систему TGF β рецепторов. Подробно описана роль монооксида азота и его производных, в частности нитрозильных комплексов железа в регуляции физиологических процессов в клетке. В специальном разделе рассмотрены сведения об этиологии и патогенезе эндометриоза. В разделе, посвященном биохимическим аспектам заболевания, подробно рассмотрены сигнальные пути, регулирующие метаболизм в эндометриоидных очагах, в частности описано пути передачи сигнала в клетке при действии представителей семейства регуляторных факторов TGF β , к которому принадлежит исследуемый гормон ингибин. Литературный обзор достаточно полно отражают данные современной литературы.

В главе, посвященной материалам и методам исследования, приведено подробное описание биофизических и клинических методов, использованных в работе. Необходимо отметить, что использование модели экспериментального эндометриоза позволило автору изучать действие ДНКЖ и ингибина на рост и развитие клеток эндометрия как бы в условиях *in situ*, что позволяет существенно сузить зону поиска возможных путей регуляции по сравнению с эффектом на целом организме. Используя классические методы исследования: данные морфологии, некоторые поведенческие реакции организма в сочетании с грамотным статистическим анализом, диссертант получил достоверные сведения о феномене воздействия ингибина и ДНКЖ на эндометриоидные очаги. Хочу подчеркнуть, что дальнейшие исследования механизмов воздействия ДНКЖ и ингибина, таким образом, базируются на этом твердом фундаменте. В целом могу заключить, что использованные методы адекватны поставленным задачам.

Раздел экспериментальных результатов состоит из трех основных частей. В первой части проведено исследование воздействия гормона ингибина на развитие эндометриоидных

очагов. Здесь следует отметить использование для оценки эффекта соединений непараметрических статистических методов – критерия Колмогорова-Смирнова и теста Манна-Уитни, которые сравнивают экспериментальные группы по форме распределения и положению медианы соответственно. То есть, использованные критерии, дополняя друг друга, усиливают надежность полученных результатов. Во второй части работы представлены данные о влиянии на модель эндометриоза динитрозильных комплексов железа с низкомолекулярным лигандом — глутатионом. Здесь также используются упомянутые статистические методы анализа. В третьей части работы проведены физико-химические исследования препарата ингибина. Было показано, что трехминутное прогревание раствора ингибина существенно увеличивает его активность. Анализируя способность ингибина образовывать комплексы с М-ДНКЖ, авторы делают вывод о том, что тепловая обработка ренатурирует гормон, молекулярная структура которого была повреждена в результате процесса выделения. Без сомнения, существуют белки способные восстанавливать структуру в цикле нагревание-охлаждение. Однако, с моей точки зрения полученных результатов недостаточно для однозначного вывода. С помощью ЭПР можно оценить структуру лишь некоего фрагмента молекулы, содержащего несколько цистеиновых остатков с которыми связываются МНКЖ, а какова структура остальной части молекулы неизвестно. В заключении автор подводит итоги, подчеркивая важность и необходимость дальнейшего уточнения роли динитрозильных комплексов железа как внутриклеточной сигнальной молекулы. Обсуждается перспективность разработки новых лекарственных средств на основе таких комплексов.

Автореферат диссертации адекватно отражает содержание работы и позволяет ознакомиться с логикой исследования и выводами автора. Основные положения диссертации отражены в опубликованных автором печатных работах, в число которых входит необходимое количество статей в журналах из списка, рекомендуемого ВАК для публикации результатов диссертационных исследований. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 5 в журналах, рекомендованных ВАК, и 2 — в зарубежном научном журнале, и 4 тезисов докладов на российских и международных конференциях. Выводы работы отражают собственные результаты исследований автора.

В то же время необходимо перечислить ряд замечаний:

1. В целом, диссертация написана хорошим языком, однако, встречаются неясные формулировки. Например, положение 2 выносимое на защиту звучит как экспериментальный результат.

2. Имеются опечатки, так в таблице 3 на стр. 57 для теста Манна-Уитни вместо значения достоверности различия приведены неизвестные цифры.

3. Отсутствие подробного описания микроскопической картины эндометриоидных очагов создает некоторые трудности восприятия материала у читателя не гистолога.

4. Результаты по воздействию ингибина, выделенного различными способами, представляются мне излишними, поскольку не добавляют ничего принципиально нового к основному результату.

5. Анализ динамики длительности болевых приступов требует более тщательного статистического анализа. Зависимости, представленные на рис. 29 и 30, необходимо подтвердить численно.

6. В качестве механизма гибели эндометриоидных клеток под воздействием исследуемых веществ автор предполагает апоптоз. Однако экспериментальных доказательств именно этого типа клеточной гибели в диссертации нет.

Однако это не умаляет ценности диссертации.

В заключение можно сказать, что в диссертационной работе Ткачева Н.А. проведен большой комплекс разносторонних исследований, основные результаты получены впервые, практическая ценность не вызывает сомнений. Диссертация представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, отвечающее всем требованиям ВАК к кандидатским диссертациям, и соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года. Автореферат и публикации полностью отражают материалы работы, диссертационный материал неоднократно докладывался на ведущих российских и международных конференциях. Автор диссертации, Ткачева Н.А., безусловно, заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.01.02 – «биофизика» и 03.01.04 – «биохимия».

26 мая 2015

Доктор биологических наук

Константин Олегович Муранов

Ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химических основ биологической регуляции
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской Академии наук
119334, Москва, ул. Косыгина д. 4,
Тел. (495) 9397441
e-mail: k.muranov@sky.chph.ras.ru

