

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Фроловой Марии Сергеевны «Дефлавинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика»

Большинство заболеваний, связанных со старением, в частности нейродегенеративные и сердечнососудистые заболевания, сопровождаются нарушением функционирования митохондрий. Цель данной работы предотвратить повреждение митохондрий, вызванное избыточным образованием супероксида при диссоциации флавиновых коферментов в патологических условиях. На основании литературного обзора и полученных данных можно предполагать, что исследованные процессы деградации флавинов могут проходить *in vivo*, а продукты их деградации могут служить биомаркерами патологических изменений. В диссертационном исследовании Фроловой Марии Сергеевны предлагается новый подход и новые мишени для предупреждения развития митохондриальных дисфункций, что, несомненно, является актуальным. Актуальность исследования связана также с выяснением условий, ведущих к образованию липофусцина – продукта перекисного окисления белков и липидов. Липофусцин является давно известным, но слабо охарактеризованным компонентом стареющих тканей, его исследование также является важной задачей. Предложена модель получения липофусцина *in vitro*, которая может быть использована для оценки уровня окислительного стресса и подбора веществ, способных минимизировать митохондриальные повреждения, что также является актуальной задачей современной биологии и медицины.

Диссертационная работа М.С. Фроловой носит фундаментальный характер, однако полученные результаты также имеют практическое значение и могут быть учтены в дальнейшем при разработке новых

диагностических и терапевтических подходов лечения различных заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа изложена на 116 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, главы «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Библиографический список включает 10 отечественных и 201 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 40 рисунками и 8 таблицами. В качестве общего комментария хочется отметить, что представленные материалы свидетельствуют о достаточно большом объеме проделанной работы. Диссертация и автореферат хорошо оформлены.

Введение включает требуемые разделы «Актуальность работы», «Цель работы», «Задачи исследования», «Научная новизна работы», «Практическая значимость работы», «Положения, выносимые на защиту», «Апробация работы», «Публикации», позволяющие читателю получить представление о сути и подходах диссертационного исследования.

Формулировка цели работы сразу показывает не только масштабность и комплексность исследования, но и полноту изучения объекта. Далее это подтверждается четкой и логичной постановкой задач исследования. Положения, выносимые на защиту, сформулированные понятно и лаконично, также подтверждают фундаментальную и практическую значимость исследования.

Обзор литературы хорошо структурирован, написан на основе современных актуальных источников и литературных обзоров. Автор приводит имеющиеся на сегодняшний день данные о роли флавоферментов в окислительно-восстановительных процессах и в метаболизме митохондрий в целом. Делается упор на то, что большинство флавиновых коферментов связаны нековалентными связями, что говорит об их неустойчивом положении в ферменте. Подчеркивается, что, так как все флавопротеиды в

той или иной форме являются источниками активных форм кислорода, то нарушение их функционирования ведет к разнообразным патологиям. Несмотря на большое разнообразие флавинодержущих ферментов, участвующих в образовании супероксида, основной упор делается на строении и функции комплекса I, и при ознакомлении с результатами и выводами исследования становится ясно почему. Разделы, посвященные образованию активных форм кислорода и появлению липофусцина в митохондриальной суспензии, логично связаны. Липофусциновая проблематика описывается достаточно подробно. Кроме того, автор проводит анализ возможности использовать для детекции супероксид-аниона хемиллюминесцентный зонд MCLA.

Обзор литературы очень хорошо иллюстрирует понимание автором современного состояния исследований по теме диссертации, выявляет «горячие точки» нерешенных задач и полностью обосновывает цели диссертационного исследования.

Раздел «Материалы и методы» достаточно полно описывает условия и протоколы экспериментов, что делает возможным их воспроизведение и проверку результатов. Большой набор методов подтверждает высокую квалификацию Фроловой Марии Сергеевны. Методы полностью соответствуют поставленным задачам, они современны и широко используются как российскими, так и зарубежными исследователями, и служат подтверждением надежности и достоверности полученных результатов.

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит подробное описание выполненных экспериментов и их анализ. В начале экспериментальной части охарактеризована модель исследования процесса диссоциации флавиновых коферментов в ходе инкубации суспензии выделенных митохондрий при 37 °С в течение 2 ч. Особенно важно, что продемонстрирована статистическая достоверность и проведены контроли на функциональную активность митохондрий. Разработаны условия, при которых можно модулировать

свободное и связанное с ферментами состояние их коферментов. Наблюдается обратная взаимосвязь между связанным положением кофермента и продуцированием супероксида суспензией митохондрий. Впервые показано, что флавиновые коферменты не просто диссоциируют от ферментов, но и подвергаются гидролизу до рибофлавина, который также может быть источником супероксида при определенных условиях. Разработан и оптимизирован удобный метод получения липофусцина в выделенных митохондриях печени крысы, с помощью которого можно тестировать антиоксиданты, прооксиданты и другие вещества. Прослеживается взаимосвязь между диссоциацией флавинов и образованием липофусцина. Особенно хочется отметить тщательное проведение всевозможных контролей в экспериментах с измерением содержания супероксида в суспензии с использованием хемилюминесцентного зонда MCLA. Полученные в работе данные являются новыми и вносят вклад в прогнозирование и разработку новых подходов для лечения всевозможных митохондриальных дисфункций. Этот раздел диссертации отличается большим объемом экспериментальной работы, которая выполнена с большой тщательностью автором. Ценным является не только получение большого объема результатов, но и их анализ.

По результатам работы сформировано 4 вывода, которые соответствуют поставленным задачам и свидетельствуют об их успешном решении.

Текст диссертации читается легко благодаря четкой логике изложения полученных результатов. Однако, имеются следующие замечания и вопросы:

1. Определение скорости потребления кислорода суспензией выделенных митохондрий проводили в гипотонической NaCl-среде. В чем смысл использования данной среды?

2. Почему длительная инкубация митохондрий проводилась в отсутствие субстратов? Это достаточно жесткие условия для эксперимента с выделенными митохондриями.

3. С учетом того, что химическая природа липофусцина не до конца понятна, было бы правильным провести микроскопические исследования препаратов митохондрий и сравнить полученные результаты с тем, что классически описывается в литературе как «липофусциновые гранулы».

4. В диссертации проводится сравнение липофусцина, полученного разными методами (с помощью нагрева и освещения). Почему полученные интересные данные не вошли в автореферат?

5. Откуда в митохондриях берутся электроны для образования супероксида, ведь инкубация проводится без добавления дыхательных субстратов?

6. В диссертации разработана модель образования митохондриального термолипофусцина, которую можно использовать для тестирования веществ на их антиоксидантную и прооксидантную способность. При этом не сформулированы основные характеристики этой экспериментальной модели: схема, основные принципы и структурные элементы.

7. Заключение по диссертации не содержит оценки результатов, полученных в диссертации, то есть преимуществ и недостатков проведенного исследования, оценки решенных и нерешенных вопросов, а значит и перспектив развития этого направления исследований.

8. Есть несколько мелких замечание грамматического характера. Например, на стр.3 автореферата – «в течении (правильно «в течение») 2 часов при 37 °С в гипотоническом буфере» и др.

Высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы и ее высокий научный уровень.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. Основные результаты работы представлены в виде 4 глав двух монографий и 7 статей, опубликованных в ведущих российских и зарубежных журналах, входящих

в базы Web of Science и Scopus. Результаты работы были представлены Фроловой М.С. на российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах с опубликованием 8 тезисов в материалах конференций.

Заключение. Диссертационная работа Фроловой Марии Сергеевны на тему «Дефламинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок предлагается новое понимание и решение проблемы развития окислительного стресса в митохондриях с помощью предотвращения дефламинизации митохондриальных флавопротеидов. В работе использованы разнообразные современные методы и подходы, поэтому достоверность и воспроизводимость полученных результатов не вызывают сомнения.

Таким образом, представленная работа полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присвоения научных степеней», предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а Фролова Мария Сергеевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика».

Доктор биологических наук, профессор,
зав. кафедрой биофизики Института
фундаментальной биологии ФГАОУ ВО
«Сибирский федеральный университет»
Адрес: 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79
Телефон рабочий: +7 (391) 206-20-72, 206-3-07
Электронная почта: VKratasyuk@sfu-kras.ru

ФГАОУ ВО СФУ
Подпись В.А. Кратасюк заверяю
Начальник общего отдела Морозова
03 2020г.



5.03.2020

В.А. Кратасюк

Кратасюк Валентина Александровна

Подпись зав. кафедрой, д.б.н., профессора Кратасюк В.А. ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь СФУ, к.б.н.

И.И. Морозова

И.И. Морозова

Кратасюк Валентина Александровна

Научные степени

1995 – Доктор биологических наук, диплом ДК № 001555, 7.04.1995, диссертация по специальности 03.00.02 - биофизика "Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение".

1985 – Кандидат биологических наук, диплом БЛ № 015470, 13.06.1985, диссертация: по специальности 03.00.02 - биофизика: "Ингибиторный биоллюминесцентный микроанализ".

Научные звания

2003 – Профессор по кафедре биофизики, диплом PR № 009462, 15.10.2003

1991 – Старший научный сотрудник, диплом СН № 071975

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Сибирский федеральный университет», **заведующая кафедрой биофизики**, г. Красноярск

Адрес места работы: Сибирский федеральный университет, пр.Свободный, 79 660041 Красноярск

Список основных публикаций заявителя за последние 5 лет

1. **Kratasyuk V.A.**, Kolenchukova O.A., Litvinova I.S., Tereshchenko S.Y. Bioluminescence analysis of saliva as non-invasive evaluation assay of physical exertion in human. // *Allergy*. – 2019. – Vol. 74 (S106). – P. 396-397.
2. Говорун А.Е., Есимбекова Е.Н., **Кратасюк В.А.** Функционирование НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы в условиях макромолекулярного краудинга: моделирование in vitro. // *Докл. Акад. наук*. – 2019. – Т. 486. – N. 4. – С. 500–503. (IF 0,612)
3. Kirillova M.A., R. Ranjan, Esimbekova E.N., **Kratasyuk V.A.** Role of Hsp90 and ATP in modulating apyrase activity and firefly luciferase kinetics. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – Vol. 131. – P. 691–696. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.110 (IF 4.784, WoS, Q1).
4. Deeva A.A. , Zykova E.A., Nemtseva E.V., **Kratasyuk V.A.** Functional divergence between evolutionary-related LuxG and Fre oxidoreductases of luminous bacteria // *Proteins: Struct., Funct., Bioinformatics*. – 2019. – Vol. 87. – N. 9. – P. 723–729. DOI: 10.1002/prot.25696
5. Калябина В.П., Есимбекова Е.Н., Торгашина И.Г., Копылова К.В., **Кратасюк В.А.** Принципы конструирования биоллюминесцентных ферментных биотестов для оценки качества сложных сред. // *Докл. Акад. наук*. – 2019. – Т. 485. – N. 2. – С. 229–233. DOI: 10.1134/S1607672919020042 (IF 0,612)
6. Litvinova I., O. Kolenchukova, A. Gilyuk, **V. Kratasyuk** Chemiluminescent method for the determination of the phagocytic activity of blood monocytes from patients with gastric duodenal erosions // *Helicobacter*. – 2018. – Vol. 23 (S1). – P. 12525–0502.
7. Sutormin O. S., Irina E. Sukovataya, Shubhra Pande, Valentina **A.Kratasyuk** Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase.// *Molecular Catalysis*, - 2018. – Vol. 458. – Part A. – P. 60–66. DOI - doi.org/10.1016/j.mcat.2018.08.012 (IF 2.938)

8. Esimbekova E.N., Kalyabina V.P., Kratasyuk V.A. Application of bioluminescent enzymatic tests in ecotoxicology // *Journal of International Scientific Publications, Ecology & Safety*, – 2018. - Vol. 12. -P. 135-146.
9. Ranjan R., Esimbekova E.N., **Kratasyuk V.A.** Rapid biosensing tools for cancer biomarkers // *Biosensors and Bioelectronics*, - 2017. - V. 87. - P. 918-930 . DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.061. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.061>. IF=8,173, Q1
10. Ranjan R., Esimbekova E.N., Kirillova M. A., **Kratasyuk V. A.** Metal enhanced luminescence: Current trend and future perspectives - A review//*Analytica Chimica Acta*,-2017 - V.971, - P.1-13, DOI: 10.1016/j.aca.2017.03.051. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28456278>. IF=5,123, Q1
11. Esimbekova E.N., Nemtseva E.V., Bezrukikh A.E., Jukova G.V., Lisitsa A.E., Lonshakova-Mukina V. I., Rimatskaya N.V., Sutormin O.S. and **Kratasyuk V.A.** Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials // *Toxicology in Vitro*, - 2017 -45P1 - P. 128-133. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.08.022 . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28882704>. IF=3,105, Q2.
12. Deeva A. A., Temlyakova E.A., Nemtseva E.V., Sorokin A.A., **Kratasyuk V.A.** Differences of the active site structure as revealed by sequence analysis of slow and fast bacterial luciferases// *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 2015. – Vol.33 – SI 1 – P.115-116 (IF 2.919).