

УТВЕРЖДАЮ

Директор федерального государственного
бюджетного учреждения «Институт
Биохимической физики
им. Н.М. Эммануэля Российской академии наук
д.х.н., профессор, Курочкин Илья Николаевич

От « 10 » февраля 2020 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Фроловой Марии Сергеевны «Дефламинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 – биофизика.

1. Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Фроловой М.С. посвящена исследованию роли флавинадениндинуклеотидов (FAD) и флавиномононуклеотидов (FMN) и продукта их деградации рибофлавина в образовании активных форм кислорода в изолированных митохондриях в модельных условиях. Исследованы также условия, ведущие к образованию липофусцина – продукта окисления липидов и белков в митохондриях и клетках. Нарушение работы митохондрий, связанное с их окислительным повреждением, является причиной ряда патологий. Одной из установленных причин и триггеров повреждения митохондрий является нарушение работы NADH: убихинон-оксидоредуктазы и других флавопротеидов, в результате чего образуется избыточное количество супероксид аниона. В работе сделана попытка выяснить какое влияние процесс диссоциации флавиновых коферментов оказывает на образование супероксида и к каким последствиям это может вести с точки зрения окисления митохондриальных мембран.

Второй аспект, определяющий актуальность темы диссертационной работы, касается возможности повлиять на процесс диссоциации флавиновых коферментов с целью уменьшения образования активных форм кислорода. Изучение протекторных свойств аналогов никотинамидадениндинуклеотида (NAD), которые могут быть ответственны за сохранение нековалентной связи между флавиновыми коферментами и апоферментами, и при этом влиять на количество образуемого в митохондриях супероксид аниона - одна из задач, решаемых в данной работе.

Третий аспект диссертационной работы связан с разработкой методики получения искусственного липофусцина *in vitro*. Сравниваются два продукта образования липофусцина при разных способах воздействия (УФ облучение и нагревание). Диссертант показал, что при нагревании и УФ облучении образуются два разных продукта. Кроме того, предложенный метод получения липофусцина был протестирован на ряде антиоксидантов и веществ, обладающих восстановительными свойствами. Результаты по протекции диссоциации флавиновых коферментов хорошо и логично связаны с уменьшением образования липофусцина в условиях *in vitro*.

Учитывая все вышеперечисленные аспекты, актуальность исследования не вызывает сомнений.

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

В диссертационном исследовании Фроловой М.С. были поставлены адекватные задачи, которые удалось решить с использованием классических и современных биофизических и биохимических методов исследований, а именно флуоресцентной

спектроскопии, хемилюминесценции, спектрофлуориметрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, полярографии. Достоверность представленных результатов подтверждается обширным экспериментальным материалом и статистической обработкой данных.

Все поставленные задачи исследования решены. Выводы и практические рекомендации взаимно не противоречат, опираются на экспериментальные данные и отражают результаты проведенного исследования. Результаты исследования являются новыми. Научные положения данной работы расширяют и углубляют современные представления о механизмах развития окислительного стресса в митохондриях и клетках.

3. Научная новизна диссертационной работы

Впервые показано, что помимо диссоциации от митохондриальных апоферментов флавиновые коферменты (FAD и FMN) претерпевают гидролиз до рибофлавина. На данный процесс влияют аналоги никотинамидадениндинуклеотида, содержащие фосфатную группу, такие как аденозин фосфаты и гуанозин фосфаты. При этом наблюдается взаимосвязь с образованием супероксид аниона и митохондриального липофусцина.

Разработана модель получения термо-липофусцина, которая может быть использована в лабораторных условиях для тестирования анти- и прооксидантных свойств различных препаратов.

4. Значение результатов исследования для теории и практики.

Результаты, полученные в данном экспериментальном исследовании, обладают как теоретической, так и практической значимостью. С позиции фундаментальной науки, результаты исследования дают представление о дополнительных механизмах развития окислительного стресса в митохондриях и о возможных способах влияния на данный процесс. С практической точки зрения, полученные результаты открывают перспективы для исследования новых терапевтических мишеней.

5. Оценка содержания диссертации, ее завершенность и оформление.

Структура диссертации является традиционной и включает введение, обзор литературы с шестью подглавами, главы «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения» с десятью подглавами, заключение, выводы, список использованной литературы. Диссертация изложена на 116 страницах, содержит 40 рисунков и 8 таблиц. Список литературы включает в себя 211 источников, 10 отечественных и 201 зарубежных. Список является исчерпывающим, приведенные ссылки имеют непосредственное отношение к теме диссертации.

В обзоре литературы автор раскрывает современные представления о роли флавобелков в биогенезе митохондрий, обобщается представление о возможности флавиновых коферментов диссоциировать от апоферментов, обсуждается роль митохондриальных флавоферментов в образовании активных форм кислорода, делается упор на строении и функции NADH: убихинон-оксидоредуктазы, как на основном продуцирующем супероксид-анион флавоферменте. Дается описание процесса образования липофусцина, как одного из основных маркеров окислительного стресса, говорится о возможных дисфункциях флавоферментов, приводящие к различным заболеваниям. В завершении литературного обзора дается представление о тонкостях использования 2-метил-6-(4-метилфенил)-3,7-дигидроимидазол[1,2-а] пиазин-3(7H)-один (MCLA) в качестве хемилюминесцентного зонда для оценки радикал- продуцирующей способности суспензии выделенных митохондрий. В представленных данных упоминаются как классические работы, формирующие базовое представление об изучаемом вопросе, так и новые, современные исследования, некоторые из которых опровергают уже сложившиеся утверждения. Далее описываются материалы и методы, позволившие достичь поставленные цели исследования.

В главе «Результаты и обсуждения» изложены экспериментальные данные и результаты, установленные с применением расчетных методов. В начале главы

охарактеризована модель длительной инкубации митохондрий, затем изложены данные по изменению параметров флавиновой флуоресценции и влиянию аналогов NAD на изменение общей флавиновой флуоресценции. Затем идут эксперименты с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяющие разделить флавины на три фракции. Это позволило сделать вывод о том, что в процессе инкубации FAD и FMN претерпевают гидролиз до рибофлавина, различные аналоги NAD действуют на этот процесс по-разному, что коррелирует с образованием супероксид-аниона. На основании полученных экспериментальных данных сделан вывод о том, что основной вклад в образование супероксида вносит диссоциация и гидролиз FMN из NADH:убихинон-редуктазного комплекса. Далее идет характеристика и сравнение образовавшихся в процессе нагревания и УФ облучения флуорофоров в суспензии митохондрий, который диагностируются как липофусцин. Проводится изучение действия различных химических соединений и различных условий на образование липофусцина. Устанавливается взаимосвязь между процессом диссоциации флавиновых коферментов и образованием липофусцина. Представленные выводы достаточно полно раскрывают результаты и задачи исследования.

6. Подтверждение публикации основных результатов диссертации в научной печати.

Представленные результаты прошли апробацию на международных и всероссийских научных конференциях в форме устных сообщений и стендовых докладов. Основные результаты диссертационной работы отражены в 19 печатных работ, из них 7 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 4 главы в 2-х монографиях, 8 тезисов в материалах конференций.

7. Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание и основные положения диссертации.

8. Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Основные результаты получены либо лично автором, либо при непосредственном его участии, включая планирование и проведение экспериментов. Важно отметить, что в подавляющем большинстве опубликованных работ автор занимает первое место, что подтверждает лидирующую роль диссертанта в представленной работе.

В целом диссертация заслуживает высокой оценки. Однако есть замечания, которые не влияют на общую положительную оценку работы.

1) В автореферат и в выводы работы не вошла интереснейшая часть, которая есть в самой диссертации, по фотооблучению суспензии митохондрий, работа бы только выиграла от этого.

2) Соискателю следовало бы привести больше данных по дополнительным параметрам флавиновой флуоресценции, например, провести эксперименты по кинетике затухания флуоресценции.

Заключение

Диссертация Фроловой Марии Сергеевны на тему «Дефлавинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы» является самостоятельным завершённым научным исследованием, в котором решена научная задача – установлена взаимосвязь между диссоциацией и гидролизом флавиновых коферментов и развитием окислительного стресса в суспензии митохондрий.

По актуальности и объёму проведенных исследований, обоснованности данных, научной новизне и важности полученных данных работа полностью соответствует требованиям пунктов 9, 10 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (редакция от 28.08.2017), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Фролова Мария Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Отзыв рассмотрен и одобрен на совместном семинаре лабораторий процессов фотосенсибилизации и физико-химических основ рецепции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН) (протокол № 1 от 10 февраля 2020 г.).

Доктор химических наук,
Профессор, заведующий лабораторией
фотосенсибилизации ИБХФ РАН
Кузьмин Владимир Александрович

Доктор биологических наук,
Профессор, академик РАН, заведующий
лабораторией физико-химических основ рецепции
ИБХФ РАН
Островский Михаил Аркадьевич

Подпись Кузьмина Владимира Александровича
и Островского Михаила Аркадьевича
заверяю.
ученый секретарь ИБХФ РАН,
к.б.н. С.И. Скалацкая



« 10 » февраля 2020 г.

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
Тел. (495) 939-7439, e-mail: ibcp@sky.chph.ras.ru

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Лаборатория Процессов фотосенсибилизации, заведующий д.х.н., профессор
Кузьмин Владимир Александрович

Лаборатория Физико-химических основ рецепции, заведующий академик
РАН, д.б.н., профессор Островский Михаил Аркадьевич

Адрес: 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Список основных публикаций за последние 5 лет:

- 1) Kostyukov A.A., Nekipelova T.D., Borissevitch I.E., Kuzmin V.A.
Interaction of the Triplet State of Biscarbocyanine Dye with a Nitroxyl Radical // High Energy Chemistry (2019) том 53, № 1, с. 87-88
- 2) Podrugina T.A., Pavlova A.S., Doroshenko I.A., Kuz'min V.A., Kostyukov A.A., Shtil' A.A. Synthesis and photophysical properties of conformationally fixed tricarbocyanines with phosphonate groups // Russian Chemical Bulletin (2018) том 67, № 5, с. 806-814
- 3) Shtil A.A., Olshevskaya V.A., Zaitsev A.V., Radchenko A.S., Petrova A.S., Markova A.A., Miyoshi N., Borissevitch I.E., Kuzmin V.A. Chemical modifications of tetrapyrrole and carbocyanine scaffolds: On the road to optimized antitumor photosensitizers // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy (2017) том 17, с. 24-25
- 4) Kostyukov A.A., Pozdnyakova N.V., Shevelev A.B., Radchenko A.S., Golovina G.V., Klimovich O.N., Shtil' A.A., Codognato D.C.K, Gonçalves P.J., Pavanelli A.L.S, Ferreira L.P., Amado A.M., Borisevich Y.E., Kuzmin V.A. Complexes of alpha-fetoprotein and serum albumin with biscarbocyanine dye // High Energy Chemistry (2017) том 51, № 3, с. 233-235
- 5) Pavanelli R., A L.S., Mostaçõ L.B., Schaberle F.A., Galembeck S.E., Gonçalves P.J., Silva Costa e., Ferreira R., L P., Nekipelova T.D., Kostyukov A.A., Radchenko A.S., Shtil A.A., Kuzmin V.A., Borissevitch I.E. Phototransformation of cyanine dye with two chromophores. Effects of oxygen and dye concentration // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry (2017) том 349, с. 42-48
- 6) Ushakova N., Dontsov A., Sakina N., Bastrakov A., Ostrovsky M. Antioxidative Properties of Melanins and Ommochromes from Black Soldier Fly *Hermetia illucens* // Biomolecules (2019) том 9, № 9, с. 408-408
- 7) Яковлева М.А., Сакина Н.Л., Кольчугина И.Б., Арбуханова П.М., Борзенко С.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А. Сравнительное

- исследование оксидантных свойств окисленных и неокисленных бисретиноидов липофусциновых гранул ретинального пигментного эпителия глаза человека // Патогенез (2019) том 17, № 1, с. 66-71
- 8) Feldman Tatiana B., Yakovleva Marina A., Larichev Andrey V., Arbukhanova Patimat M., Radchenko Alexandra Sh, Borzenok Sergey A., Kuzmin Vladimir A., Ostrovsky Mikhail A. Spectral analysis of fundus autofluorescence pattern as a tool to detect early stages of degeneration in the retina and retinal pigment epithelium Eye // (2018) том 32, с. 1440-1448
- 9) Сакина Н.Л., Донцов А.Е., Дегтярев Е.Н., Коварский А.Л., Арбуханова П.М., Борзенок С.А., Островский М.А. Сравнительная оценка содержания меланина в составе меланосомы меланолипофусциновых гранул клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека // Офтальмохирургия в журнале Офтальмохирургия, (2018) № 1, с. 78-82
- 10) Яковлева М.А., Фельдман Т.Б., Арбуханова П.М., Борзенок С.А., Кузьмин В.А., Островский М.А. Время жизни флуоресценции флуорофоров, содержащихся в липофусциновых гранулах клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека, в норме и в случае визуализируемой патологии // Доклады Академии наук (2017) том 474, № 6, с. 760-765
- 11) Яковлева М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Арбуханова П.М., Фельдман Т.Б., Борзенок С.А., Островский М.А. Механизмы окислительного действия света на липофусциновые гранулы из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека: роль супероксидных радикалов // Сенсорные системы (2017) том 31, № 3, с. 227-236
- 12) Яковлева М.А., Фельдман Т.Б., Арбуханова П.М., Борзенок С.А., Кузьмин В.А., Островский М.А. Определение времени жизни флуоресценции флуорофоров, содержащихся в липофусциновых гранулах клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека без признаков патологии // Доклады Академии наук (2017) том 472, № 2, с. 226-229