

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Фроловой Марии Сергеевны

на тему: «Дефламинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика

Актуальность темы.

Диссертация М.С.Фроловой «Дефламинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы» посвящена исследованию свойств выделенных митохондрий и явлениям, происходящим в них с течением времени. Целью диссертационного исследования являлось изучение роли дефламинизации митохондрий печени крысы в генерации супероксида и образовании липофусцина в различных условиях, а также влияния различных веществ и воздействий на эти два процесса.

Актуальность выбранной темы не вызывает сомнений – в последние десятилетия изучение митохондрий и роли генерируемых ими активных форм кислорода стало одним из ключевых направлений современной биологии и медицины, а открытия, сделанные в этой области, позволили разработать ряд принципиально новых терапевтических подходов и лекарственных средств. Эксперименты на выделенных митохондриях по-прежнему играют важнейшую роль как в фундаментально-научных исследованиях, так и в прикладных работах на этапе доклинических исследований. Понимание динамики изменения свойств препаратов митохондрий со временем, а также детальное изучение процессов, обуславливающих эти изменения – важный шаг на пути к разработке четких и воспроизводимых митохондриальных моделей, на которых можно тестировать научные гипотезы до перехода к экспериментам на живых клетках и опытам *in vivo*.

Научная новизна и практическая значимость исследований.

В диссертации М.С.Фроловой представлены результаты, обладающие научной новизной, имеющие практическую значимость:

- Показано, что в выделенных митохондриях печени крысы при инкубации в течение 2 часов при 37°C происходит дефламинизация митохондриальных ферментов с последующим гидролизом FAD и FMN с образованием рибофлавина. Этот процесс

приводит к увеличению флавиновой флуоресценции, а также к повышению генерации митохондриями супероксида. Это позволило выдвинуть гипотезу, согласно которой в качестве возможной причины развития окислительного стресса в клетке предложена генерация супероксида, вызванная дефлавинизацией митохондриальных флавоферментов.

- Была разработана модель ускоренного образования липофусцин-подобного вещества *in vitro* в выделенных митохондриях печени крысы при облучении ультрафиолетовым светом и при длительном нагревании. Полученные данные позволяют лучше понять механизмы, связанные с повреждением митохондрий, а также могут быть использованы для разработки новых моделей для скрининга перспективных фармакологических средств, в первую очередь – для оценки их антиоксидантных и прооксидантных активностей.

- Наконец, было установлено, что аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты уменьшают образование супероксида при инкубации суспензии выделенных митохондрий в течение 2 часов при 37°C и, как следствие, уменьшают уровень перекисного окисления липидов и образование липофусцина. Данный результат позволяет предположить, что уровень пуриновых нуклеотидов может оказывать определенное влияние на окислительный стресс в живой клетке.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Обоснованность и достоверность полученных М.С.Фроловой результатов не вызывает сомнений. Эксперименты выполнены на хорошем уровне в нескольких повторах. Результаты диссертационной работы докладывались на многочисленных конференциях, а также на научных семинарах. Выводы, приведенные в диссертации, соответствуют полученным результатам.

Рекомендации по использованию результатов диссертации.

Результаты диссертационного исследования М.С.Фроловой могут быть использованы как теоретическая база для разработки систем скрининга перспективных веществ-кандидатов, обладающих антиоксидантным и геропротекторным действием, а также способных снижать скорость генерации митохондриями активных форм кислорода и скорость образования липофусцина.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Текст диссертации М.С.Фроловой содержит 120 страниц и имеет классическую структуру. После Введения, в котором автор освещает актуальность и цель работы, задачи исследования, научную новизну и практическую значимость работы, формулирует

положения, выносимые на защиту и приводит информацию об апробации работы, публикациях, структуре и объеме диссертации, следует раздел «1. Обзор литературы». Этот раздел написан достаточно подробно (29 страниц) и освещает современное состояние исследований в области флавобелков митохондрий, генерации активных форм кислорода митохондриальными флавоферментами, строения и функций NADH:убихинон-оксидоредуктазы, а также дает информацию о процессе образования липофусцина и дисфункциям флавоферментов, приводящих к заболеваниям человека. В последнем разделе Обзора литературы автор пишет о преимуществах и недостатках метода активированной MCLA хемилюминесценции для оценки радикал-продуцирующей способности суспензии выделенных митохондрий.

В разделе «2. Материалы и методы», которому посвящены 7 страниц диссертации, перечислены использованные в работе реагенты и аппаратура, после чего идет описание применявшихся в работе методик, включая выделение изолированных митохондрий из печени крыс, измерение уровня супероксида с помощью хемилюминесценции MCLA, определение уровня NADH-зависимой редуктазной активности митохондрий, уровня потребления кислорода суспензией выделенных митохондрий печени крысы, определение общей флуоресценции флавина и липофусцина в суспензии выделенных митохондрий печени крысы и другие методики, а также краткое описание подходов, использованных для анализ данных.

За разделом «2. Материалы и методы» следует раздел «3. Результаты и обсуждения», в котором дается описание полученных в ходе работы результатов, занимающее основную часть текста диссертации (44 стр).

Завершают текст диссертации небольшое Заключение, Выводы и Список литературы, содержащей ссылки на 211 литературных источников, большая часть которых – англоязычные публикации в международных научных реферируемых журналах, список публикаций по теме диссертации, список статей в реферируемых журналах, рекомендованный ВАК, и перечисление публикаций в сборниках материалов конференций.

Текст диссертации проиллюстрирован 40 рисунками.

В целом диссертация М.С.Фроловой может рассматриваться как законченное исследование, представляющее решение нескольких отдельных актуальных задач, объединенных общим подходом.

Замечания по работе. К содержанию работы могут быть сделаны следующие замечания:

1. Во введении автор пишет, что «В митохондриях лишь один фермент, сукцинатдегидрогеназа связывает флаavin ковалентной связью». Однако, как минимум еще 2 фермента в митохондриях связывают флаavin ковалентной связью – это саркозин-дегидрогеназа и диметилглицин дегидрогеназа
2. В разделе об апробации работы сказано, что «Апробация работы была проведена на совместном заседании коллектива сотрудников»; неясно, что это были за сотрудники и какой организации, и когда произошло их заседание.
3. Обзор литературы содержит значительные фрагменты, оставляющие устойчивое ощущение автоматического перевода с английского. Это сразу видно по речевым оборотам типа «супероксидные ионы клетки», «флавинсвязывающих складок», «наличие моющих средств». В ряде мест при этом отсутствует ссылка на англоязычную публикацию, из которой были взяты куски. Так, на стр. 17, 18 и 21 автор приводит целые абзацы, переведенные из работы *Stepanova et al. Reverse electron transfer results in a loss of flavin from mitochondrial complex I: Potential mechanism for brain ischemia reperfusion injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2017 Dec; 37(12):3649-3658. doi: 10.1177/0271678X17730242*, без указания этой работы в списке цитируемой литературы. В частности, в последнем абзаце на стр. 17 автор пишет: «Наши эксперименты поддерживают идею, что именно FMN, а не FeS кластеры, являются основным местом генерации H₂O₂.» Однако это не эксперименты автора, а эксперименты Александра Галкина, Анатолия Старкова и других со-авторов публикации в *J Cereb Blood Flow Metab* поддерживают данную идею. Хотелось бы надеяться, что это только техническая ошибка, допущенная соискателем при оформлении диссертации, поскольку ссылку на эту статью я нашел в публикациях М.С. Фроловой
4. Стр. 19 литературного обзора: автор пишет, что «Имеются данные, что перекись водорода не выходит из митохондриального матрикса в межмембранное пространство и цитозоль [8].» В источнике по ссылке мне не удалось обнаружить указанных данных; более того, совершенно неясно, как можно удержать перекись водорода внутри митохондрий. Более того, сам автор на стр.30 пишет о способности перекиси дрейфовать через мембраны. Неясно, откуда взялось и что означает утверждение о неспособности перекиси покидать митохондрии на стр. 19
5. На стр. 25 автор пишет, что «... NADH: убихинон редуктаза является мажорным белком [92].» Сам термин «мажорный белок» вызывает недоумение и мысль о машинном переводе с английского. Кроме того, источник [92] – это краткая (меньше 1 стр) аннотация книги Ленинджера «Митохондрия», написанная в 1965 г Б.Гессом на немецком языке. И там ничего не сказано о «мажорности» NADH: убихинон редуктазы.
6. Общее замечание по оформлению иллюстраций и схем (стр. 15, 20, 26, 33, 68). Следовало бы перевести на русский язык подписи на рисунках и схемах

7. Рис. 16 и 17 на стр. 61-62: что обозначает индекс «NA» - никотинамид? Из подписи к рисунку это неочевидно.
8. В экспериментах на рис.18 на странице 63: неясно, почему автор интерпретирует эффект добавки ЭДТА (1мМ) как результат хелатирования ионов железа, которых в растворе 10 мМ. Насколько я понимаю, ионы железа в десятикратном избытке по сравнению с добавленным ЭДТА.
9. На стр. 73 автор пишет: «Мы нагревали суспензию митохондрий до 49°C в течение 3 часов, что фактически являлось ускорением «состаривания» препаратов митохондрий.» Нельзя не отметить, что фактически это было экстремальным нагреванием биологического препарата; автор может предполагать, что такая обработка в каких-то отдельных аспектах может напоминать процессы, идущие при старении, но некорректно утверждать, что такая обработка фактически им является. В следующем абзаце текста автор выдвигает предположение, что подобные температуры могут быть нормальны для функционирования митохондрий. Это предположение довольно смелое, и одновременно легко проверяемое экспериментально с помощью измерения зависимости активности препаратов митохондрий от времени инкубации при 49°C. Если автор действительно полагает, что трехчасовая инкубация митохондрий при 49°C не является для них экстремальным стрессом, значительно снижающим их активность, то следовало бы подкрепить эту гипотезу соответствующими экспериментами. (Впрочем, на стр. 82 автор пишет, что «в этих условиях происходит частичная денатурация белков, агрегация и возникают ковалентные сшивки, в частности – шиффовы основания в липофусцине»)
10. В тексте диссертации и автореферата имеется некоторое количество грамматических ошибок и опечаток, однако их число невелико, в отличие от довольно большого количества англицизмов, стилистически странных оборотов и проблем с грамматическим согласованием.

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования М.С.Фроловой.

Общее заключение.

Основные результаты диссертации опубликованы в 7 статьях в рецензируемых отечественных и международных журналах, включенных ВАК в перечень ведущих периодических изданий. Результаты диссертационного исследования прошли апробацию на нескольких конференциях, в том числе международных.

Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают основное содержание диссертации, и вполне исчерпывающе характеризуют результаты проведенных исследований.

Уровень решенных в ходе работы задач можно признать соответствующим требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертации соответствует специальности 03.01.02 – Биофизика

Диссертационное исследование Фроловой Марии Сергеевны «Дефламинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы» является завершенной работой, которая по критериям актуальности, научной новизны, обоснованности достоверности выводов соответствует требованиям, предъявляемым к научно-квалификационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Диссертант Фролова Мария Сергеевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Официальный оппонент,

доцент факультета биоинженерии и биоинформатики

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

к.б.н.



Б.А.Фенюк

feniouk@fbb.msu.ru

+7-495-939-3107

Декан факультета биоинженерии и биоинформатики

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

академик РАН



В.П. Скулачев

Фенюк Борис Александрович

Научная степень:

1998 – Кандидат биологических наук, диссертация по специальности 03.00.04 – биохимия – «Исследование механизма сопряжения синтеза АТФ и протонного транспорта АТФ-синтазой из пурпурной бактерии *Rhodobacter capsulatus*.»

Научные звания:

2011 г. – доцент МГУ имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики

2016 г. - зам. директора Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, зам. директора,

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, **ведущий научный сотрудник**, г. Москва

Адрес места работы: 119234 г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73

Список основных публикаций заявителя за последние 5 лет

- 1) Lapashina A.S., Shugaeva T.E., Berezina K.M., Kholina T.D., **Feniouk B.A.** 2019 Amino Acid Residues beta139, beta189, and beta319 Modulate ADP-Inhibition in *Escherichia coli* H⁺-FOF1-ATP Synthase // *Biochemistry (Moscow)*, V. 84, № 4, 407-415
- 2) Lapashina Anna S., **Feniouk Boris A.** 2019 Mutation Q259L in subunit beta in *Bacillus subtilis* ATP synthase attenuates ADP-inhibition and decreases fitness in mixed cultures *Biochemical and Biophysical Research Communications*, V. 509, № 1, 102-107
- 3) Lapashina AS, Prikhodko AS, Shugaeva TE, **Feniouk BA** 2019 Residue 249 in subunit beta regulates ADP inhibition and its phosphate modulation in *Escherichia coli* ATP synthase // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, V. 1860, № 3, 181-188
- 4) Lapashina A.S., Feniouk B.A. 2018 ADP-Inhibition of H⁺-FoF1-ATP synthase Lapashina A.S., **Feniouk B.A.** // *Biochemistry (Moscow)*, V. 83, № 10, с. 1141-1160
- 5) Knorre Dmitry A., Azbarova Aglaia V., Galkina Kseniia V., Feniouk Boris A., Severin Fedor F. 2018 Replicative aging as a source of cell heterogeneity in budding yeast // *Mechanisms of Ageing and Development*, V. 176, с. 24-31
- 6) Feniouk B.A., Skulachev V.P. 2017 Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants // *Current aging science*, V. 10, № 1, с. 41-48
- 7) Travin D.Y., Feniouk B.A 2016 Aging in birds // *Biochemistry (Moscow)*, V. 81, № 12, с. 1558-1563