

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Федеральный исследовательский центр

«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Институт биофизики клетки Российской академии наук

- обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН

(ИБК РАН)

30 сентября 2019 г.

Заключение межлабораторного научного семинара по результатам рассмотрения диссертационной работы Фроловой М.С. «Дефламинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы»

Диссертация «Дефламинизация и окислительный стресс в деградирующих митохондриях печени крысы» выполнена в лаборатории внутриклеточной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН). В период подготовки диссертации Фролова Мария Сергеевна обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) и работала в ИБК РАН в должности инженера, а затем – младшего научного сотрудника.

В 2005 г. окончила биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (кафедра клеточной биологии и гистологии). В настоящее время работает младшим научным сотрудником лаборатории геномного редактирования и трансгенеза ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов «история и философия науки», «английский язык» и «биофизика» выдана 02.10.2019 г. ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Научный руководитель – д.б.н., Векшин Николай Лазаревич, ведущий научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации ИБК РАН. Научный руководитель и тема диссертационной работы утверждены решением Ученого совета ИБК РАН от 17.04.2014 Протокол № 3.

Результаты диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата биологических наук были заслушаны на межлабораторном научном семинаре ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН 30.09.2019 г.

По результатам рассмотрения диссертации «Нарушение флавинового гомеостаза с образованием супероксида и липофусцина в митохондриях печени крысы» принято следующее заключение:

Диссертация Фроловой М.С. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны положения, имеющие актуальное научное и практическое значение для понимания фундаментальных механизмов развития окислительного стресса, а также для разработки потенциальных диагностических и терапевтических стратегий. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к квалификационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Актуальность темы

Согласно свободорадикальной теории, одной из причин старения является избыточное образование свободных радикалов, основным источником которых являются митохондрии (German and Brunk 1998). В среднем, в нормальном состоянии «утечка» электронов на кислород с образованием активных форм кислорода составляет 1-5% (Lee et al. 1998). С возрастом и при патологических процессах перепроизводство супероксида митохондриями может приводить к окислительному повреждению митохондриальных белков, мембран и ДНК. При этом нарушается способность митохондрий синтезировать АТФ, нарушается цикл трикарбоновых кислот, цикл окисления жирных кислот, цикл мочевины, метаболизм аминокислот, синтез и сборка гемов и железо-серных кластеров, которые являются центральными для нормальной работы окислительно-восстановительных систем клеток. Окислительное повреждение мембран митохондрий способствует образованию «пигмента старения» липофусцина, выходу межмембранных белков, таких как цитохром с, в цитоплазму и тем самым активизирует апоптоз клетки. Окислительное повреждение митохондрий сопутствует широкому спектру клеточных патологий (Murphy et al., 2009). Наиболее подверженными к накоплению липофусцина являются долгоживущие неделящиеся специализированные клетки: нейроны, кардиомиоциты, клетки пигментного эпителия сетчатки и другие.

Практически все митохондриальные источники супероксида, кроме комплекса III, являются флавинзависимыми ферментами (Sies et al., 2017). Известно, что флавопротеины могут обратимо распадаться на составляющие: апопротеин и простетическую группу

(Theorell et al., 1935) Дефлавоинизация в экспериментальных условиях наблюдается при: понижении pH, изменении концентрации солей, применении растворителя и повышении температуры (Nefli et al., 2003), а также в присутствии детергентов (Erpink et al., 2008). Есть данные, что основной причиной снижения активности комплекса I после ишемии является потеря FMN ферментативным комплексом (Kahl et al., 2018). Значительное снижение уровней FAD и FMN наблюдается при дегенерации сетчатки, которое приводит к гибели клеток фоторецепторов (Kelley et al., 2017). Отмечалось заметное уменьшение соотношения концентраций FAD/рибофлавин в плазме крови пациентов в отделениях реанимации по сравнению со здоровыми людьми (Vasilaki et al., 2010). Исследователи утверждают, что данный фактор может служить мерой оценки статуса критически больного пациента (Vasilaki et al. 2010).

В наших условиях при инкубации суспензии выделенных митохондрий (умеренная гипотония и отсутствие субстратов) происходит набухание митохондрий, которое может служить моделью патогенетических изменений при многих заболеваниях человека, связанных с окислительным стрессом, таких как ишемия (инфаркт), реперфузия, гипоксия, воспаление, диабет, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания (Javadov et al., 2018). При этом, в условиях митохондриального набухания мы наблюдали тотальную дефлавоинизацию митохондриальных ферментов (Frolova, Vekshin, 2019). Величина соотношения FAD/рибофлавин и FMN/рибофлавин коррелируют с количеством супероксида в суспензии (Frolova, Vekshin, 2019).

Антиоксиданты хорошо справляются с проблемой активных форм кислорода в условиях *in vitro*, останавливая окислительные процессы в соответствующих клеточных средах. Но существуют проблемы транспортировки антиоксидантов в клетку, которые даже если и решаются, то общее количество молекул антиоксиданта составит не более чем 0,01% от уже существующей в клетке ферментативной антиоксидантной системы (Chen et al., 2012). Кроме того, все больше выявляется побочных эффектов употребления антиоксидантов. Есть работы, где прием антиоксидантов приводил к повышению риска развития раковых и других заболеваний (Lapointe et al., 2010; Ristow et al., 2014). Поэтому нужно искать альтернативные способы защиты от переизбытка свободных радикалов. Одним из них является предложенный автором способ предотвращения дефлавоинизации митохондриальных ферментов. Полученные данные позволяют лучше понять один из возможных механизмов образования активных форм кислорода в митохондриях и могут помочь при дальнейшей разработке потенциальной терапевтической стратегии.

Научная новизна

1) Впервые показано, что основным процессом, отвечающим за изменение флавиновой флуоресценции в суспензии выделенных митохондрий печени крысы, является дефлавинизация митохондриальных ферментов, сопровождающаяся гидролизом FAD и FMN с образованием рибофлавина.

2) Показано, что в присутствии NADH дефлавинизация флавопротеинов приводит к образованию супероксида как минимум в трех процессах. Первый из них протекает в комплексе I в результате спонтанного выхода FMN из активного центра. Этот процесс подавляется аденозин- и гуанозин- фосфатами, а также NAD; но усиливается никотиномидом. Второй процесс связан с ферментативным гидролизом пиррофосфатазами FAD до FMN и FMN до рибофлавина; он блокируется EDTA, AMP, никотиномидом и NAD. Третий процесс связан с неферментативным гидролизом FAD в матрице ионами железа; он блокируется EDTA и AMP.

3) Показано, что в выделенных митохондриях печени крысы липофусцин образуется спонтанно, без дополнительных факторов (насыщение кислородом, прооксиданты). При нагревании суспензии митохондрий до 49°C в течение 3 часов образуется термолипофусцин, который был охарактеризован. Основной вклад в образование митохондриального термолипофусцина вносит окисление денатурированных белков. Данная модель была использована для тестирования антиоксидантов и восстановителей.

4) Аденозинфосфаты и гуанозинфосфаты за счет замедления дефлавинизации митохондриальных субстратов уменьшают образование супероксида и, как следствие, уменьшают уровень перекисного окисления липидов и образование липофусцина в суспензии выделенных митохондрий.

Связь темы с планом основных научных работ учреждения

Результаты, представленные в данной работе, были получены в ходе выполнения исследований, проведенных в рамках планов научно-исследовательских работ ИБК РАН по теме государственного задания. 2017-2019. «Механизмы функционирования рецепторов, ионных каналов и внутриклеточных сигнальных систем в различных типах клеток в норме и при патологиях. Поиск потенциальных мишеней для фармакотерапии» (Раздел VI. "Биологические науки", подраздел 61. "Биофизика, радиобиология, математические модели в биологии, биоинформатика" Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы, номер

госрегистрации АААА-А17-117032050020-3, тема 61.3 (0116-2018-0004), государственное задание № 007-01453-17-001) на 2017 год и на плановый период 2018 и 2019 годов.

Кроме этого, представленные результаты были получены в ходе выполнения исследований, проведенных в рамках следующих проектов: стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов от МинОбрНауки СП-2027.2015.4, грантов РФФИ 14-34-50310, 16-34-00159.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Исследования по теме диссертации были проведены соискателем лично. Автор самостоятельно выдвигал ряд идей, реализованных в работе. Часть экспериментов по проведению HPLC хроматографии флавинового профиля митохондрий проведена совместно с Марченковым В.В. Все материалы опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на конференциях. Автор принимал непосредственное участие в написании и оформлении статей и тезисов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации

Для достижения поставленной цели и решения конкретных задач были использованы современные методы высокочувствительной флуоресцентной спектроскопии, хемолюминесцентный анализ, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Практическая значимость работы

Работа расширяет представление о причинах развития окислительного стресса в митохондриях, который возникает в том числе благодаря дефлавинизации митохондриальных флавоферментов. Образование свободных радикалов и липофусцина возможно предотвратить с помощью стабилизации флавинов в флавоферментах аденозинфосфатами и гуаинозинфосфатами. Эти вещества являются природными, не токсичны и не являются антиоксидантами.

В ходе работы промоделирован процесс развития окислительного стресса и образования липофусцина *in vitro* в выделенных митохондриях печени крысы при облучении видимым светом и при длительном нагреве. Полученные данные позволяют лучше понять механизмы, связанные с повреждением митохондрий и помогут при дальнейших разработках потенциальных терапевтических препаратов.

**Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она
рекомендуется к защите**

По характеру полученных результатов и использованным методам работа соответствует специальности 03.01.02 – «биофизика» на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Апробация работы

Результаты работы были представлены в виде устных сообщений и тезисов конференций: Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация: Международная конференция (Пушино, 2019), V Съезд Биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), Экспериментальная и теоретическая биофизика (Пушино, 2015), Mitochondrial pores and channels as pharmacological targets – 2014 (Pushchino, 2014), Конференции Биология – Наука XXI Века: 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 2013 г.), Нейроинформатика (Москва, 2013).

Публикации

По результатам работы опубликовано 20 печатных работ, в том числе 8 статей в научных рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, рекомендуемых ВАК, 4 главы в двух монографиях.

По результатам обсуждения работы на межлабораторном научном семинаре ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН были высказаны следующие замечания и рекомендации:

В названии работы используется понятие «флавинового гомеостаза», хотя основные результаты посвящены характеристике однонаправленного процесса дефлавинизации митохондриальных ферментов в искусственной системе изолированных митохондрий. С этой точки зрения не совсем корректно использование понятия «гомеостаза» в названии.

Условия, моделирующие окислительный стресс и образование липофусцина за счет дефлавинизации митохондриальных белков далеки от физиологических, целесообразно более четко обосновать выбор использованных экспериментальных подходов и сопоставить результаты автора с данными, полученными при физиологических условиях.

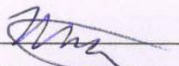
Следует уделить больше внимания характеристике химической природы образующихся в результате дефлавинизации продуктов.

С учетом внесения исправлений на основании высказанных замечаний диссертация Фроловой Марии Сергеевны «Нарушение флавинового гомеостаза с образованием супероксида и липофусцина в митохондриях печени крысы» по критериям

объема выполненной экспериментальной работы и количества публикаций может быть рекомендована к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Заключение принято на межлабораторном научном семинаре ИБК РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Присутствовало на заседании 20 чел. Результаты голосования «за» - 20 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол от 30.09.2019 г.

30.09.2019 / 
 Шавкунов Константин Сергеевич
 К.б.н., ученый секретарь
 тел. +7(4967)731890
 e-mail - admin@icb.psn.ru


 Масулис Ирина Станиславовна,
 К.б.н., заместитель директора по науке
 тел. – +7(4967)739237
 e-mail - admin@icb.psn.ru

