

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Слатинской Ольги Вадимовны
на тему: «Исследование конформации и распределения гемоглобина при
функционировании эритроцита»
по специальности 1.5.2. биофизика (биологические науки)**

Актуальность темы:

Диссертация Слатинской Ольги Вадимовны на тему «Исследование конформации и распределения гемоглобина при функционировании эритроцита» по специальности 1.5.2. биофизика (биологические науки) посвящена исследованию конформации и распределения гемоглобина в клетке при изменении ряда экстраклеточных параметров (pO_2 , температура, pCa^{2+} и концентрация Na^+ в клетке). Постановка цели и задач исследования важны для понимания роли молекулярных механизмов в процессе переноса кислорода и формирования гипоксии в организме человека. Автор, также затрагивает изучение механизма «молекулярного краудинга» в эритроците, т.е. роли переориентации и формирования олигомерных комплексов гемоглобина в регуляции конформации гемоглобина. Важно, что для проверки гипотезы о влиянии гипоксии на конформацию гем-белка и образования гомогенных структур Слатинская О.В. использовала большой набор современных методов (Раман-спектроскопия, ИК-спектроскопия, SERS, ЛИМ и т.д.), что свидетельствует как о владении методиками, так и понимании использования методов для решения конкретной задачи исследования. Отмечу новаторство в использовании КР-спектроскопии и SERS для оценки конформации гемоглобина как в цитоплазме клетки, так и в растворе. Это позволило автору убедительно доказать роль молекулярного краудинга в реализации конформации гемоглобина при различных воздействиях на клетку. Важно, что в своей работе Слатинская О.В. использовала воздействия, которые как правило приводят к изменению либо

ζ -потенциала поверхности мембраны, либо мембранного потенциала или ионного гомеостаза и, параллельно, изменяют конформацию и распределение молекул гемоглобина в цитоплазме эритроцита. Таким образом, было доказано предположение о возможности неоднородного распределения гемоглобина в цитоплазме эритроцита, за счет формирования олигомерных структур в эритроците.

Структура и объем диссертации:

Диссертация написана в классическом стиле и содержит все необходимые разделы. Во введении, автор обосновывает актуальность работы, формулирует её цель и задачи, выделяет объект и предмет исследования, описывает, в чём состоит научная новизна и практическая значимость работы, перечисляет объект и предмет исследования, научную новизны, практическую значимость работы, степень достоверности результатов, акцентирует внимание на своём личном вкладе в работу и обозначает структуру и объём диссертации. Объём диссертации составил 253 страницы, имеет 87 рисунков, 13 таблиц и сопровождается 400 источниками литературы.

В первой главе приведен обзор литературы, в котором автор анализирует современные данные о функционировании эритроцита, конформационных изменениях гемоглобина при изменении парциального давления кислорода, температуры, изменении концентрации экстраклеточного кальция и блокировании натриевого насоса. Последний раздел данной главы посвящен биомедицинским изменениям функционирования эритроцита при патологии – идиопатической легочной гипертензии.

Во второй главе описаны методики приготовления образцов для исследования, а также спектроскопические методы исследования. На мой взгляд, описание каждого метода проводится подробно и сопровождается

теоретическим обзором, формулами, схемами приборов и ряда установок. Очевидно, что представленный в данном разделе материал позволяет оценить достоверность полученных автором результатов и отвечает задачам диссертационной работы.

В третьей главе, результаты исследования представлены автором в шести разделах, в которых последовательно излагаются результаты исследований конформационных изменений внутриклеточного и выделенного гемоглобина (основной метод исследования - Раман-спектроскопия). Я отмечу, что на протяжении всей работы, автор анализирует конформационные изменения и перераспределение цитоплазматического и мембраносвязанного гемоглобина отдельно. Помимо этого, в работе были использованы такие параметры гемоглобина, как среднее время жизни триптофановой флуоресценции, конформационные изменения колебаний амидных связей в белках (ИК-спектроскопия), размер молекул гемоглобина (динамическое светорассеяние). Важно, что все эти параметры для молекул гемоглобина в цитоплазме эритроцита существенно отличаются от параметров молекул выделенного гемоглобина. Существенное внимание привлекает исследование и анализ результатов, полученных с помощью ЛИМ и микротомографии. Впервые это позволило не только выявить наличие перераспределения молекул гемоглобина при изменении поверхностного потенциала клетки, но и выявить области с максимальной динамикой таких изменений.

Выводы диссертации Слатинской О.В. соответствуют поставленным задачам, формулируют новизну исследования и практическую реализацию полученных теоретических представлений. Завершая рассмотрение работы, отмечу, что диссертационное исследование произвело на меня вполне благоприятное впечатление. Все поставленные цели достигнуты, изложение материала внятное и легко воспринимается.

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

Степень обоснованности научных положений и сформулированных в диссертации выводов Слатинской О.В. определяется несколькими важными обстоятельствами. Во-первых, грамотно сформулирована научная гипотеза и используется экспериментальная база диссертации. Во-вторых, выбраны корректные методы для проведения экспериментов и выполнения исследований. В-третьих, достаточно глубокое изучение эритроцита и гемоглобина на протяжении последних 100 лет не помешало диссертанту по-новому взглянуть на объект, отражая современные тренды развития биофизики и молекулярной биологии.

Выдвинутые гипотезы доказаны с помощью современных методов оптической спектроскопии, а также критического анализа полученных результатов при сопоставлении с данными мировой научной литературы. Поставленные задачи решены полностью. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы и логически вытекают из представленного материала. Они соответствуют содержанию работы, аргументировано доказываются соответствующими исследованиями и заслуживают одобрения.

Основные результаты работы

Считаю, что важным является вывод диссертации, свидетельствующий о роли перераспределения и ориентации молекул гемоглобина (цитоплазматического и мембраносвязанного гемоглобина) при физиологическом воздействии на эритроциты, а также при патологии. Например, пятый раздел третьей части диссертации, где автор демонстрирует перераспределение молекул гемоглобина в цитоплазме эритроцита с помощью методов поляризованной Рамановской спектроскопии и фазово-контрастной микроскопии.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Новизна исследования Слатинской О.В. не вызывает сомнений. Представленный экспериментальный материал имеет теоретическое и практическое значение: впервые проведено комплексное и систематическое экспериментальное исследование внутриклеточных и внеклеточных конформационных изменений цитоплазматического гемоглобина при вариации pO_2 , температуры, а также электрических изменений состояния плазматической мембраны эритроцита. Автором впервые показана взаимосвязь между плотностью упаковки глобина и куполообразной конформацией гема и их зависимостью от величины ζ -потенциала. Отмечу, что в работе, основное внимание автор сосредоточил на применении методов, которые позволяют визуализировать перераспределение и образование олигомерных структур в цитоплазме эритроцита.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.

Положения, выносимые на защиту достоверны, результаты согласуются и дополняют известную информацию из литературных источников. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с применением современных методов оптической спектроскопии и микроскопии.

По результатам диссертационной работы опубликовано 8 работ, среди которых 1 патент и 7 научных статей в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и входящих в перечень индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus. Основные результаты работы представлены автором в форме 15 устных и стендовых докладов на международных и всероссийских конференциях.

Оценка содержания диссертации в целом, замечания и вопросы по содержанию диссертации.

Эритроциты представляют собой клетки кровеносной системы, с высокой степенью деформации, обладающие пластичностью и осуществляющие главную роль в кислородтранспортном обмене. Однако, до настоящего времени остается ряд вопросов, связанных с процессами, осуществляемыми в условиях высококонцентрированной среды цитоплазмы – «молекулярного краудинга». Имеющиеся теоретические модели не учитывают всех процессов, протекающих в клетке, и имеют ряд допущений (как, например, представление всех молекул в сферическом представлении, либо представление всех молекул гемоглобина в дезоксигенированной форме). Ввиду этого, видится важным получение результатов с нативной клетки, что было продемонстрировано в работе Слатинской О.В.

В работе исследованы конформационные изменения гем-белка и олигомеризация молекул гемоглобина, выявлены интересные факты, в частности проведено сравнение выделенного гемоглобина с цитоплазматическим и мембраносвязанным гемоглобином в одинаковых условиях. Анализ конформационных изменений гема и глобина гемоглобина пациентов с идиопатической легочной гипертензией имеет диагностическую ценность, что обуславливает и новизну, и практическую ценность диссертационной работы.

Одним из главных достижений работы, на мой взгляд, является рациональное использование современной техники, особенно, КР-спектроскопии, SERS, лазерной микротомографии, что позволило Слатинской О.В. впервые достоверно выявить изменения локализации молекул гемоглобина в эритроците при изменении поверхностного заряда и мембранного потенциала. Очевидно, что эта работа требует не только профессионализма в использовании данных метод, но и сочетание этих

методов с нативностью биологического объекта (клетка эритроцита, тени эритроцитов).

Диссертационная работа выполнена на высококачественном уровне, из замечаний можно отметить следующее:

На стр.8 диссертационной работы автор вводит понятие «куполообразной конформации», в которой атом железа «выходит» из плоскости порфиринового «цикла» и расстояние между атомом Fe^{2+} и плоскостью порфирина составляет около $0,9 \text{ \AA}$. При этом термин «куполообразная конформация» заключается в кавычки и далее упоминается по всему тексту диссертации более семидесяти раз также в кавычках. Представляется, что заключение термина в кавычки является избыточным и скорее вводит читающего в некоторое замешательство по поводу столь частого использования кавычек. Всё-таки термин вполне адекватно описывает наблюдаемую конформацию гема.

Заключение:

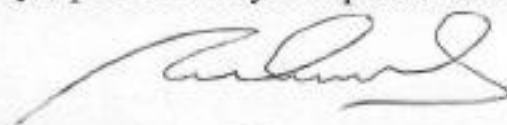
Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2. биофизика (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Слатинская Ольга Вадимовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. биофизика (биологические науки).

Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук,
профессор кафедры физики полимеров и кристаллов Отделения физики
твердого тела физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

Яминский Игорь Владимирович



28 августа 2023 года

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-1009, e-mail: yaminsky@nanoscopy.org.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 01.04.19 – Физика полимеров

Адрес места работы:

119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 2,

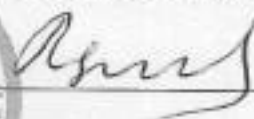
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова», физический факультет, кафедра физики полимеров и
кристаллов, Отделение физики твердого тела, Кафедра физики полимеров и
кристаллов

Тел.: +7 (495) 939-1009; e-mail: yaminsky@nanoscopy.org

Подпись профессора физического факультета ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет имени М.В.Ломоносова» Яминского И.В.
удостоверяю:

Ученый секретарь Ученого совета физического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова,

д.ф.-м.н., профессор



В.А.Караваяев