

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента о диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук Морозовой Ксении Игоревны на тему: «Редокс-состояние дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов в норме и при патологиях в условиях *in vivo*» по специальности 1.5.2 – «Биофизика»**

### **Актуальность темы исследования**

Энергообеспечение клеток головного мозга осуществляется более, чем на 90% митохондриями. Несмотря на многочисленные исследования биохимических и физических процессов, протекающих в чрезвычайно сложно структурированных митохондриях, детальное понимание молекулярных механизмов требует расширения методов и приемов изучения функционирования митохондрий, особенно в их естественном внутриклеточном окружении. Диссертационная работа Ксении Игоревны Морозовой является примером очень целенаправленного исследования переноса восстановительных эквивалентов (формально переноса электрона) по дыхательной цепи, которая упорно и последовательно осуществляется исследовательским коллективом под руководством Н.А. Браже. Творчески используя метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР-спектроскопии), диссертант решала вопросы о том, как происходит перенос электрона по дыхательной цепи от комплекса III на комплекс IV с участием цитохромов С и Б отдельно в двух типов клеток мозга, а именно, в нейронах и астроцитах, причем как в срезах мозга, так и в живых объектах – мышах, экспрессирующих флуоресцентные репортерные белки. Учитывая сложность объектов исследования и разнообразие процессов, происходящих в мультиферментных комплексах дыхательной цепи, этого было бы достаточно для положительного ответа на вопрос об актуальности диссертационного исследования Ксении Игоревны. Однако диссертант пошла дальше и провела исследования окислительно-восстановительных процессов в митохондриях с участием цитохромов С и Б у мышей, служащих моделью болезни

Альцгеймера и у мышей, имеющих опухоль мозга. Более того, отработанные на животных моделях методические приемы и полученные с их помощью фундаментальные знания и функционировании комплексов III и IV дыхательной цепи позволили получить уникальные сведения о функционировании этих комплексов в послеоперационных препаратах мозга людей разного возраста. Подобное многообъектное исследование функционального состояния участка дыхательной цепи митохондрий с привлечением самых современных приемов КР-спектроскопии в сочетании с методами генной инженерии и разнообразными флуоресцентными сенсорами, делает диссертационное исследование К.И. Морозовой бесспорно актуальным не только в теоретическом отношении, но и в прикладном аспекте.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертация К.И. Морозовой построена традиционным образом, начинается со Списка сокращений, за которым следуют главы: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и завершается «Списком литературы», включающим 98 наименований. Полный объем диссертации составляет 126 страниц с 51 рисунками и 3 таблицами.

**Введение** включает несколько подразделов. Обсуждаются актуальность и степень разработанности исследуемой темы, с акцентом на особенности взаимодействия цитохрома С с комплексами III и IV. Сформулированы цель исследования и 3 основные задачи, решение которых потребуется для их достижения. Положения, выносимые на защиту, кратко раскрывают ответы на поставленные задачи. Научная новизна работы продемонстрирована тем, что методическое развитие спектроскопии комбинационного рассеяния позволяют оценить окислительно-восстановительные состояния гем-содержащих белков цитохрома С в составе изолированных митохондрий, этих органелл внутри индивидуальных кардиомиоцитов и даже в изолированном сердце в нормальном и патологическом состояниях. Описание

методов исследования очень сжатое, но, тем не менее, дает представление о сложности и новизне инструментария и методологии. Сведения о публикациях в рецензируемых научных изданиях и выступлениях на конференциях дают представление о достоверности результатов диссертационной работы и о личном вкладе автора.

### **Обзор литературы**

Выстроен по параграфам в соответствии с последующим изложением экспериментального материала. В главе «Литературный обзор» Ксения Игоревна цитирует 89 работ (90%) из всего списка публикаций. Обзор несколько перегружен упоминанием работ старше 7 лет (61% ссылок), преимущественно обзоров. При этом упущены некоторые идеологически и методически близкие исследования, например, статья Abramczyk et al. (Double face of cytochrome c in cancers by Raman imaging. Sci Rep. 2022). Относительно скромная доля свежих публикаций обусловлена, в значительной мере, новизной применения КР-микроспектрометрии (Раман-микроспектрометрии) в исследовании функционального состояния митохондрий, особенно в живом мозге свободнодвижущихся животных и при различных патологиях и возраст-зависимых изменений в организме.

В целом все 13 параграфов Обзора литературы вполне удовлетворительно подготавливают читателя к продуктивному усвоению каждого симметричного параграфа главы «Результаты и Обсуждение». Отметим, что «Литературный обзор» завершается кратким итогом проанализированного литературного материала и обосновывает актуальность постановки всех 3-х задач диссертационного исследования, решение которых описано в последующих главах диссертационной работы, обосновывает выбор КР-спектроскопии в качестве основного метода. Необычным приемом заключительной части «Литературного обзора» является наглядное графическое представление различий в работе дыхательной цепи нейронов и астроцитов и какова схема исследований вытекает из выполненного Обзора.

Глава «**Материалы и Методы**» написана в стиле, характерном для молодых исследователей, руководимых Надеждой Александровной Браже, и включает детальное описание всех методических вопросов вплоть до приготовления растворов. В целом глава «Материалы и Методы» создает впечатление, что задумана, как четкий протокол, инструкция и образец для последующих начинающих исследователей. К данному случаю применимо выражение: «Стабильность – признак класса!», которое можно дополнить: «И Надежное продолжение научной школы Кафедры Биофизики!»

Несколько необычно, что раздел «Материалы и Методы» не содержит ни одной цитированной работы, хотя явно есть параграфы, в которых были бы естественны упоминания более ранних методических разработок коллектива, в котором выполнено диссертационное исследование или, например, работ, в которых описаны векторы для экспрессии флуоресцентных белковых сенсоров.

Глава «Материалы и Методы» демонстрирует, что для исследования очень комплементарно подобраны биофизические, молекулярно-биологические, физиологические методы, вплоть до микрохирургии и тренировки животных выполнения КР-микроспектрометрии. Для достижения этого автором диссертационной работы и ее коллегами выполнен огромный объем работы.

Глава «**Результаты и обсуждение**» включает в себя описание и анализ большого объема экспериментальных данных и логично разделена на 4 раздела (3.1-3.4), в каждом из которых автор подробно описывает и анализирует полученные данные. Результаты иллюстрированы 51 рисунками с достаточно детальным описанием графиков, которые, в ряде случаев, дополнены изображениями (Рис. 14, 18, 22, 29). К сожалению, наглядные флуоресцентные изображения мозга, в клетках которого экспрессированы флуоресцентные белковые сенсоры, не дополнены ни одним изображением, иллюстрирующим особенности КР-микроспектрометрии.

Полученные результаты позволили автору сделать некоторые довольно смелые предположения. Например, «Для нейронов важную роль играет энергетическая функция митохондрий, в то время как астроциты, вероятно, используют комплексы ЭТЦ как сенсоры микроокружения, чувствительные к изменениям в концентрациях метаболитов и кислорода, а также как источники сигнальных молекул.» Такой новый взгляд на функцию астроцитов интересен хотя бы тем, что «покушается» на устоявшиеся, «канонические» функции астроцитов, такие, как формирование гематоэнцефалического барьера и поддержание морфологии ткани мозга.

Очень интересны и уникальны результаты на так называемых «тканях доступа» мозга, которые получают при хирургических операциях удаления злокачественных опухолей мозга человека. Оказалось, что соотношение липидов и белков зависит от возраста пациентов и имеет противоположную направленность в астроцитах и нейронах. Эти результаты предоставляют новый взгляд на возраст-зависимые процессы в мозге человека и, вероятно, будут источником ценной информации при планировании дальнейших исследований мозга человека. Конечно, методы КР-микроспектроскопии при всей их привлекательности, безусловно, нуждаются в подтверждении и обогащении другими физико-химическими методами для прояснения того насколько процедура приготовления образцов для микроспектроскопии, в частности, обработка детергентами, может влиять на интерпретацию результатов.

Еще одним результатом, который заслуживает особого упоминания, является отсутствие увеличения просвета микрососудов мозга у трансгенных мышей линии 5xFAD, служащих моделью болезни Альцгеймера. Этот феномен требует дальнейших исследований как причин, так и последствий для системы микроциркуляции мозга и, надеюсь, будет плодотворно продолжен Ксенией Игоревной и/или ее соратниками.

Все основные результаты, полученные К.И. Морозовой подытожены в главе 3.7 «Заключение» и суммированы в «Выводах».

## **Научная новизна работы**

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Ксения Игоревна впервые провела комплексное исследование переноса электронов цитохромами С и Б в митохондриях в их естественном внутриклеточном окружении, причем отдельно в нейронах и астроцитах. Причем исследования были впервые выполнены на животных, служащих моделями заболеваний человека, например, болезни Альцгеймера. Кроме того, были впервые изучены изменения транспорта электрона в дыхательной цепи при моделировании таких патологий, как гипергликемия, при диете с повышенной жировой калорийностью, а также при гипоксии мозга, вызванной фототромбозом микрососудов. Автор творчески сочетала разнообразные молекулярно-биологические подходы и работу с чисто физическими методами спектроскопии комбинационного рассеяния света и флуоресцентной микроскопии и даже освоила методы микрохирургии и микротрансфекции мозга мыши. Благодаря такому разностороннему подходу был установлен ряд фактов, подытоженных в «Выводах».

## **Степень обоснованности и достоверности выводов и основных положений диссертации**

Сформулированные в диссертационной работе научные положения и выводы основываются на достаточном объеме экспериментального материала, полученного с помощью соответствующих поставленным задачам методов и подходов. В работе использованы самые современные молекулярно-биологические, биохимические, физиологические и физические методики, применены адекватные методы статистической обработки данных. Результаты научного исследования опубликованы в 6 статьях в ведущих журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus и Web of Science, причем 4 из 6 статей имеют импакт фактор выше 5. Кроме того, результаты работ бы доложены на 7-ми Международных и Всероссийских конференциях с международным участием, по результатам которых опубликовано тезисы в сборниках материалов конференций. Факты публикации в

высокорейтинговых журналах и доклады на Конференциях и межлабораторных семинарах адекватно подтверждают достоверность полученных результатов.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

1. Стр. 43 «... вместо Triton X-100 был использован Tween-20, который не обладает детергирующим действием и, следовательно, не приводит к экстракции липидов.»

Каким образом Tween-20 делает клеточные мембраны проницаемыми для антител, если при этом не экстрагирует липиды?

2. Стр.49 «Спектр флуоресценции записывался в течение 1 с, после чего прибор переводился в режим регистрации спектров КР: время накопления одиночного КР-спектра составляло 10-20 с ...».

В чем технически состоял перевод из режима записи флуоресценции в режим регистрации КР-спектров?

3. Стр.49 «Общая продолжительность однократного эксперимента для одного животного не превышала 2 часов.»

Как выдерживают мыши такую продолжительность пребывания в установке без воды и корма? Испытывают ли они стресс и как влияет стресс на сигналы мозга?

4. Стр.50 «Через 30 мин после инъекции осуществлялась локальная фотоактивация красителя в выбранной артериоле облучением лазером с длиной волны 532 нм и мощностью 3-4 мВт на регистрируемый объем в течение 5 минут. Это приводило к прекращению кровотока в выбранном участке сосуда (здесь и далее – к локальному фототромбозу).»

Как определяли, что тромб образовался? По изменению чего?

5. Может ли, многократное сканирование лазерного луча приводить значительному облучению и (частичному) повреждению ткани мозга в исследуемом участке мозга? Как проверяли подобную возможность?

6. Стр.52. Почему анализ одиночных спектров КР (параграф 2.3.1.) не применим для анализа временных серий спектров КР (параграф 2.3.2.)?

7. Стр.60. «... скорость переноса электронов ... определяется скоростью диффузии подвижных переносчиков между комплексами.» и далее «... структура ЭТЦ определяет скорость транспорта электронов, что подтверждается данными, полученными на фиксированных образцах».

Стр. 88-89. В параграфе 3.3.1. сказано: «Для идентификации клеток было произведено ИГХ-окрашивание на GFAP (белок-маркер астроцитов) и NeuN (белок-маркер нейронов), после чего производилась регистрация спектров КР от идентифицированных астроцитов и нейронов в фиксированных срезах.»

Это наблюдение представляется весьма неординарным. Каким образом может функционировать ЭТЦ после фиксации параформальдегидом, в результате которой внутри- и межмолекулярная подвижность белковых молекул (в том числе, диффузия подвижных переносчиков, в частности, цитохрома С) «заморожена» за счет внутри- и межмолекулярных химических сшивок между аминок группами белков? Именно по этой причине обработка параформальдегидом и была названа «фиксацией»!

**Более частные замечания состоят в следующем:**

1. Стр.50. Что такое 24 ч диета? Голодание в течение суток?
2. Почему в таблице 2 не упомянута довольно интенсивная полоса вблизи 1259 см<sup>-1</sup>, которая заметно отличается в нейронах и астроцитах (Рис.9Б) изменяется при разных условиях (Рис.11)?
3. Почему в КР-спектрах мозга бодрствующих животных (Рис. 15) отсутствует полоса остатка фенилаланина, которая достаточно значительная на препаратах срезов (Рис. 9)?
4. Какие величины отложены по осям абсцисс и ординат на Рис. 22?
5. Как судили о повышении «уровня сахара в крови»? В Методах не сказано об анализе сахара в крови.

## Заключение

Диссертационная работа Ксении Игоревны Морозовой представляет собой полноценное, грамотно спланированное и тщательно выполненное научное исследование на актуальную тему, имеющую как фундаментальное, так и практическое значение. Отмеченные выше замечания носят технический характер, являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок и не умаляют научную ценность диссертационной работы. Диссертация отвечает требованиям, предъявляемым Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту 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 им. М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Морозова Ксения Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – «Биофизика».

Официальный оппонент:  
Сурин Александр Михайлович,  
доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
Лаборатория фундаментальных и прикладных проблем боли

Специальность 3.3.3 – Патологическая физиология

125315, Москва, ул. Балтийская, д.8

Тел: -

Подпись д.б.н. Сурина  
Ученый секретарь ФГБ  
к.м.н.

Е.Н. Кожевникова