

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Краснова Владимира Сергеевича
на тему: «Синтез, структурно-функциональные свойства и
тканеспецифичная инактивация митохондриальных разобщителей на
основе умбеллиферона и анилинотиофена.»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия**

Актуальность темы диссертации

Синтетические разобщители дыхания и окислительного фосфорилирования (такие как 2,4-динитрофенол) известны еще с 30-х годов прошлого века. Тогда же были предприняты первые попытки их использования в качестве липолитиков. Однако, недостаток знаний о принципах, лежащих в основе их действия, а также выявленные побочные эффекты ограничили их терапевтическое применение. Только после того, как Питер Митчелл сформулировал Хемиосмотическую теорию синтеза АТФ, а Владимир Петрович Скулачев с сотрудниками показали, что разобщители разрушают протонный градиент на мембране, снижая протонодвижущую силу, был начат поиск новых классов разобщителей, а сами они начали использоваться в лабораторных исследованиях. Открытие разобщающих белков в митохондриях бурого жира и других тканей показало, что тканеспецифичное разобщение может быть частью нормальных физиологических процессов в организме. Целенаправленный поиск искусственных разобщителей выявил, помимо производных фенола, ряд других анионных (карбонилцианиды, производные кумарина, хинолона, жирных кислот) и катионных разобщителей (производные родамина) с различными физико-химическими свойствами. Подобное разнообразие позволяет с оптимизмом смотреть на перспективы разработки и использование разобщителей не только в качестве удобного лабораторного инструмента, но и агентов для тонкого терапевтического вмешательства. В частности, мягкое разобщение может снизить генерацию активных форм кислорода, активировать процессы митофагии, биогенеза митохондрий,

катаболизма глюкозы и жирных кислот, что, теоретически, должно привести к общему улучшению функционирования митохондрий при различных метаболических и возрастных заболеваниях, включая нейродегенеративные и сердечнососудистые патологии. Отдельным направлением может быть угнетение пролиферации раковых клеток и патогенных микроорганизмов путем индукции метаболического стресса. Однако, реализация подобных стратегий требует решения вопросов тканеспецифичности и дозированности воздействия, что невозможно без понимания процессов активации и инактивации разобщителей в организме и последующего выведения их метаболитов.

Автор диссертации в работе описывает методы получения новых разобщителей на основе кумарина, путем внесения гидролизуемых и негидролизуемых заместителей в 3-е, 4-е, и 6-е положение; изучает их разобщающую активность в митохондриях из различных тканей, процессы их инактивации, а также эффекты неактивных производных на инактивацию активных. Кроме того, автор исследует механизм инактивации разобщителей с другой химической структурой – флуазинама и фенилтиофенаминов. Эта работа, несомненно, является актуальной для разработки новых подходов и средств для коррекции метаболических нарушений и возрастных патологий.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа написана по традиционной схеме и состоит из введения и 3-х глав основной части диссертации, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, а также заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа изложена на 175 страницах, иллюстрирована 4 таблицами и 71 рисунком. Список литературы содержит 156 источников. В разделе «Введение» в краткой форме изложены актуальность работы, цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов и их практическая значимость, положения, выносимые на защиту и информация о публикации и апробации результатов.

Глава «Обзор литературы» посвящена описанию строения и функций митохондрий; современных представлений о механизмах запасания энергии в форме АТФ; физико-химических свойств, механизмов действия и терапевтических эффектов естественных и синтетических разобщителей, в первую очередь, производных кумарина и фенилтиофенамина, а также флузинама; механизмов и систем детоксикации ксенобиотиков. В целом, данный раздел предоставляет исчерпывающую информацию по теме. Глава «Материалы и методы» содержит описание структуры синтезированных разобщителей; подробное описание реагентов и методов синтеза, очистки и идентификации соединений; биохимических и биофизических методов изучения митохондриальных функций, ферментативной активности и фермент-субстратных взаимодействий. Автор описывает большое количество разнообразных современных методик, что может говорить о его высокой квалификации исследователя. Глава «Результаты и обсуждения» включает описание экспериментов и результатов синтеза сложных эфиров 7-гидроксикумарин-3, (4 и 6-)-карбоновой и 7-гидроксикумарин-4-уксусной кислот; изучения их разобщающих свойств в митохондриальных системах и в искусственных мембранах; изучение механизмов их инактивации с использованием ингибиторов гидролаз, предположительно вовлеченных в этот процесс и метода молекулярного докинга; исследования эффектов производных умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты в качестве новых ингибиторов карбоксилаз; исследования механизмов разобщающего эффекта и механизмов инактивации флузинама и производных фенил-тиофенамина. Представленные экспериментальные данные дополнены кратким анализом и сопоставлением с основными данными мировой научной литературы по теме. Обобщение полученных результатов приведено в главе «Заключение».

Степень обоснованности и достоверности положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность выводов и рекомендаций диссертации обеспечивается комплексным использованием современных методик и большим объемом экспериментальных данных. Сформулированные выводы логически вытекают из полученных данных и полностью соответствуют поставленным целям и задачам. Достоверность полученных результатов определяется большим объемом полученных данных, наличием многократных повторов и титровок доза-эффект, и применением множества современных методов исследования. Результаты диссертационной работы Краснова В.С. представлены в статьях, опубликованных в авторитетных рецензируемых международных журналах; получен патент. Материалы диссертации Краснова В.С. представлены на нескольких всероссийских и международных конференциях.

Научная новизна исследования

При выполнении диссертационной работы впервые была синтезирована и протестирована на наличие разобщающих свойств серия сложных эфиров умбеллиферона, продемонстрирована зависимость их протонофорных свойств от химической структуры. Показано, что механизм их тканеспецифичной инактивации связан с ферментативным гидролизом в митохондриях печени, но не сердца крыс. Установлено, что тканеспецифичность разобщающего действия различных фенилтиофенаминов может определяться скоростью ферментативного глутатионилирования, катализируемого глутатион-S-трансферазой.

Оценка научной и практической значимости исследования

Результаты работы Краснова В.С. дают целую группу новых кумариновых разобщителей окислительного фосфорилирования, которые могут быть использованы для мягкого разобщения, продолжительность которого может тканеспецифично варьировать. Автор демонстрирует два пути ферментативной инактивации разобщителей: карбоксилэстераза-зависимый гидролиз производных 7-гидроксикумарина и глутатион-S-трансфераза-

зависимого глутатионилирования фенилтиофенаминов, что дает возможность фармакологической регуляции их разобщающего эффекта. В этом контексте важна выявленная способность производных умбеллиферон-4-глиоксалевой кислоты ингибировать карбоксилазную активность. Углубление знаний о взаимосвязи структурных и функциональных свойств производных 7-гидроксикумарина позволит привести новые подходы в разработку модульных лекарственных препаратов и пролекарств.

Вопросы и замечания

Хотя диссертационная работа Краснова Владимира Сергеевича выполнена на высоком научном уровне и содержит важные и весомые результаты, у оппонента имеется ряд замечаний и вопросов к отдельным ее частям. Основные замечания:

1. Автор одну из целей своего исследования формулирует как «Определение зависимости разобщающей активности сложных эфиров 7-гидроксикумарин-содержащих кислот от длины алкильной цепи». В то же время, фактически, автор менял не только длину цепи, но и положение заместителя, а также вводил дополнительные группы, как в цепь, так и в гидроксикумариновый гетероцикл. Это, потенциально, дает намного больше информации о механизмах действия разобщителей.

2. В Обзоре литературы, наряду с абсолютно необходимой, содержится и излишняя, повторяющаяся информация, затрудняющая чтение и восприятие. Обзору очень не хватает заключений к разделам и общего заключения к обзору, которое бы суммировало и обобщало приведенную в обзоре информацию.

3. В главе «Результаты и обсуждение», зачастую, экспериментальные данные описаны очень скупо, что мешает быстрому пониманию сути и следствий эксперимента.

4. Хотелось бы, чтобы автор схематично представил механизм действия разобщителей с учетом эффекта CATR и ингибиторов CES1, а также их локализации в митохондриях.

5. Для многих рисунков характерно, что в подписях дублируется часть вывода из данных, приведенных на рисунке, тогда как сама подпись может не содержать важной информации об условиях эксперимента.

6. Автор, часто, не обсуждает химические или биофизические основы взаимосвязи структура-эффект. Автор не анализирует, какие участки молекул протонофоров важны для ANT-зависимого транспорта. В этом контексте он не рассматривает статьи одного из своих основных конкурентов, опубликованных примерно в то же время, что и статьи автора: Bertholet AM, et al., Nature. 2022 606(7912):180-187. doi: 10.1038/s41586-022-04747-5.; Bertholet AM, et al., Nature. 2019 571(7766):515-520. doi: 10.1038/s41586-019-1400-3. Этого очень не хватает.

7. В Списке литературы присутствуют дублирующиеся ссылки: 98 и 99, 122 и 123, 132 и 133, 20 и 131.

Частные замечания:

1. В отдельных частях работы автор допускает тавтологические («дыхательная цепь переноса электронов»), заезженные («энергетической валюте клетки – АТФ»), некорректно переведенные с английского («повышение регуляции GCL»), бытовые («перекись водорода») и просто неудачные («терапевтические стратегии лечения метаболизма GSH...») выражения и термины.

2. При описании концентрационного состава инкубационных сред и растворов автор часто использует родительный падеж вместо именительного.

3. В разделе «1.3.3 Терапевтические свойства разобщителей» автор недостаточно обоснованно, на взгляд оппонента, утверждает, что митохондриальные разобщители вызывают «митохондриальный стресс и апоптоз раковых клеток, ... воздействуя на здоровые ткани в гораздо меньшей

степени». При этом автор ссылается лишь на одну работу (24. Shrestha R., et al., Mol Metab. 2021. V. 51. P. 101222) в которой приводятся данные, полученные, главным образом, на клеточных линиях.

4. В отдельных случаях встречаются досадные и ненужные ошибки: кислород называется донором электронов, флавиномононуклеотид и железосерные кластеры комплекса I названы субъединицами, а не простетической группой и кофакторами, соответственно. В разделе «Методы биофизического анализа» автор сообщает, что среднее значение концентрации выделенных митохондрий составляло 0.6-0.9 мг белка/мл, тогда как это, скорее всего, концентрация белка в пробах. В разделе «Измерения мембранного потенциала» автор утверждает, что «В среду измерения... добавляли 7 мкг митохондриального белка/мл и 15 мкМ сафранина O». Предположу, что это ошибка, так как соотношение белка и краски слишком велико. В главе 3 «Результаты и обсуждение» в разделе «3.2.1. Измерения мембранного потенциала выделенных митохондрий» автор пишет: «Глутамат... может быть преобразован в б-кетоглутарат (бКГ) трансаминированием с ОАА... а бКГ входит в цикл трикарбоновых кислот...». Очевидно, автор имел в виду α -КГ (или 2-оксоглутарат), поскольку β -кетоглутаровая или иначе ацетондикарбоновая кислота не является субстратом цикла Кребса. В подписи к Рис. 44 автор приводит концентрации октилового эфира умбеллиферон-3-карбоновой кислоты в миллимолях на литр, тогда как, очевидно, должны быть указаны микромолярные концентрации.

5. В главе разделе «3.2.2. Измерения дыхания выделенных митохондрий» автор пишет «Наблюдаемый сброс мембранного потенциала может происходить по двум причинам: протонофорной активности или ингибирования дыхания», но не говорит о третьей – пермеабиллизации внутренней мембраны, в том числе, и за счет образования пор.

6. В некоторых случаях автор вводит ссылки в заголовок перед текстом, позволяя читателю самому выбрать к какому высказыванию

относится та или иная ссылка. В частности, раздел «1.3.1. Природные разобшители – термогенины [6-10]», «1.3.2 Синтетические разобшители [13-19]», «3.8 Исследование флуазинама и производных фенил-тиофенамина [155], [156]». Это очень неудобно.

7. Возникает впечатление, что в описании Рис. 56 допущена ошибка. Иначе одна его часть противоречит другой.

Вопросы

1. В разделе «3.2.4. Измерения индукции электрического тока через искусственную БЛМ» автор приводит эффект флоретина, для подтверждения анионной природы разобшителя. Способна ли депротонированная форма ионофора вернуться за новым протоном? Влияет ли асимметрия добавок флоретина и жирных кислот на разобщающие эффекты последних?

2. На рисунке 50 автор показывает замедление исчезновения разобщающей активности UB3-C8 при прединкубации с ингибиторами CES1 – PMSF, TTFA и лоперамидом (Рис. 50). При этом, набор потенциала митохондриями с TTFA был существенно медленнее, чем в контроле, а набор потенциала после добавления разобшителя был сопоставим с контролем. Можно ли считать TTFA ингибитором гидролиза? Может ли это означать, что ферментом, осуществляющим гидролиз разобшителя, является не CES1? Какой субстрат был использован при измерении мембранного потенциала в данном случае? Проверялся ли эффект PMSF и лоперамида на ANT?

3. В разделе «3.5.4. Гидролиз сложноэфирных производных умбеллиферона коммерческой карбоксилэстеразой» автор показывает отсутствие эффекта лоперамида (наиболее эффективного ингибитора обращения сброса мембранного потенциала в митохондриях) на активность рекомбинантной CES1. Как автор может объяснить эти данные?

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 1.4.9. Биоорганическая химия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени 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 имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Краснов Владимир Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
тканевой инженерии, ФГБУН «Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН»

Круглов Алексей Георгиевич _____

подпись

09.02.2026

дата

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.00.02. Биофизика

Адрес места работы:

142290, Московская обл., г.о. Серпухов, г. Пущино, ул. Институцкая, д. 3,
стр. 1

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Тел.: +7(4967)739107; e-mail: kruglovag@mail.ru