

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Бочковой Жанны Владиславовны на тему: «Изменение конформации и окислительно-восстановительного состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий при окислительном стрессе и патологиях» по специальности 1.5.2 – «Биофизика»

Актуальность темы исследования

Энергообеспечение кардиомиоцитов осуществляется более, чем на 90% митохондриями. Несмотря на многочисленные исследования биохимических 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. В диссертационной работе Жанна Владиславовна Бочкова, профессионально используя метод спектроскопии комбинационного рассеяния света, исследовала фундаментальный вопрос о том, как тонкие конформационные перестройки гема, входящего в структуру цитохрома С влияют на эффективность переноса электрона по дыхательной цепи от комплекса III на комплекс IV. Одного этого достаточно для уверенно положительного ответа на вопрос об актуальности диссертационного исследования Жанны Владиславовны. Однако диссертант пошла дальше и провела исследования взаимодействия цитохрома С с другим гем-содержащим белком нейроглобином, локализованным в цитозоле. Подобное взаимодействие может возникать при патологических состояниях, ведущих к структурным изменениям митохондрий, выходу цитохрома С из межмембранного пространства и запуску программируемой гибели клеток, в том числе, кардиомиоцитов как в культуре, так и в самом сердце. Столь весомое дополнение к нашим знаниям о взаимосвязи патологического состояния клетки с функциональным состоянием митохондрий, к детальным сведениям о регуляции работы дыхательной цепи в результате конформационных изменений гемов и их белкового микроокружения, делает фундаментальное исследование Ж.В. Бочковой бесспорно актуальным не только в теоретическом отношении, но и в прикладном аспекте.

Структура и содержание диссертации

Диссертация Ж.В. Бочковой построена классическим образом, включает «Список сокращений», а также главы: «Введение», «Обзор

литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и завершается «Списком литературы», содержащим 152 наименования. Полный объем диссертации составляет 168 страниц с 35 рисунками и 5 таблицами.

Введение включает несколько подразделов. Обсуждаются актуальность и степень разработанности исследуемой темы, с акцентом на особенности взаимодействия цитохрома С с комплексами III и IV, и с нейроглобином. Сформулированы цель исследования и 3 основные задачи, решение которых потребуется для ее достижения. Положения, выносимые на защиту, кратко раскрывают ответы на поставленные задачи. Научная новизна работы продемонстрирована тем, что методическое развитие спектроскопии комбинационного рассеяния позволяет оценить окислительно-восстановительные состояния гем-содержащих белков цитохрома С и нейроглобина, а также 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 цитирует 152 публикации, из которых только 29 ссылок (19%) опубликованы за последние 6 лет. Относительно скромная доля свежих публикаций обусловлена, в значительной мере, новизной применения спектроскопии комбинационного рассеяния света, особенно в варианте микроспектрометрии (Раман-микроспектрометрии) в исследовании функционального состояния митохондрий, особенно в живых клетках и, тем более, в целом органе, каковым в данной работе служит изолированное сердце.

Анализ данных о взаимодействии цитохрома С с нейроглобином в отношении редокс состояния митохондрий и цитозоля представляет особый интерес для прояснения значения взаимодействия этих двух белков в регуляции биоэнергетики клеток и запуске апоптоза. Это взаимное влияние может иметь критическое значение прежде всего для мышечных клеток и нейронов, поскольку именно в этих клетках особенно велики кальциевые потоки, критически влияющие на функциональное состояние митохондрий, и содержится относительно большое количество нейроглобина.

Отдельный параграф Обзора литературы посвящен пространственной структуре гема, её зависимости от расположения боковых цепей аминокислот, заряженных или способных приобретать заряд при фосфорилировании, от конформационного состояния полипептидной цепи и условий, изменяющих конформацию.

Естественно, что в соответствии с темой диссертации наиболее детально описана та часть обзора литературы, которая посвящена методу комбинационного рассеяния света и его видам, использованным в данной работе – резонансному комбинационному рассеянию и гигантскому комбинационному рассеянию (ГКР или SERS). Приведены подробные таблицы колебаний связей в структуре гема и биообъектов, его содержащих, и примененных далее в анализе собственных данных в разделе Результаты. Эта подборка, заслуживает на наш взгляд, отдельной публикации в качестве справочного материала для более широкого круга исследователей, уже использующих или планирующих применять РКК и ГКР для исследования все более сложных объектов, например, живого мозга.

Предпоследний параграф Обзора описывает устоявшиеся, надежно документированные представления о функционировании дыхательной цепи, учет которых понадобился автору для интерпретации результатов собственных исследований.

Заслуживает упоминания то, что Обзор литературы завершается кратким итогом проанализированного литературного материала и обосновывает актуальность постановки всех 3-х задач диссертационного исследования, решение которых описано в последующих главах диссертационной работы.

Глава «**Материалы и Методы**» включает детальное описание всех методических вопросов вплоть до приготовления растворов. Местами этот раздел мог бы войти в главу «Результаты», настолько тщательным и трудоемким был подбор условий измерений. В целом глава «Материалы и Методы» создает впечатление, что задумана, как четкий протокол, инструкция и образец для последующих молодых исследователей, чем вызывает безусловное уважение как к самой Жанне Владиславовне, так и ее руководителю. В работе очень гармонично подобраны молекулярно-биологические, физиологические и биофизические методы исследования. Для этого Жанны Владиславовны и ее коллегами выполнен огромный объем работы: 1) получение мутантных форм цитохрома С и нейроглобина; 2) выделение функционально активных митохондрий из сердечных мышц; 3) синтез (совместно с коллегами) наноструктур для ГКР (SERS) и отработка

методики получения спектров ГКР цитохрома С в изолированных митохондриях; 4) приготовление долгоживущих препаратов изолированного сердца крыс и отлаживание методики съемки спектров ГКР препаратов в «норме» и при чередовании ишемии сердца с реперфузией; 5) сочетание методов КР-спектроскопии с флуоресцентными измерениями митохондриального трансмембранного электрического потенциала и образования перекиси водорода в митохондриях; 6) проверка на всех стадиях качества приготовленных образцов, например, с помощью измерения скорости поглощения кислорода митохондриями. В целом текст и иллюстрации главы «Материалы и методы» создают впечатление исследования, выполненного на очень высоком и разнообразном методическом уровне, а использованные подходы и методы совершенно адекватны для успешного решения поставленных в диссертации задач.

Глава «**Результаты и обсуждение**» включает в себя описание и анализ большого объема экспериментальных данных и логично разделена на 6 разделов (3.1-3.6), в каждом из которых автор подробно описывает и анализирует полученные данные. Результаты иллюстрированы 31 рисунками с детальным описанием графиков, которые, в ряде случаев, дополнены изображениями (Рис. 29, 34) и наглядными схемами (Рис. 7, 10, 21). Следует отметить, что Жанна Владиславовна, анализируя собственные уникальные данные, сопоставляла их с литературными данными по темам, соответствующим как параграфам главы «Результаты и обсуждение», так и разделам в «Обзоре литературы».

Все основные результаты подытожены в главе 3.7 «**Заключение**» и суммированы в «**Выводах**». Кратко результаты можно описать, на наш взгляд, таким образом.

Спектроскопия РКР и ГКР позволяет оценить редокс-состояние цитохромов С и нейроглобина, вероятность плоской конформации гемов, подвижность пирролов, сдвиг гема С в гемовой щели, а также исследовать изменение конформационных параметров гема цитохрома С при захвате электрона от редокс-партнера в условиях *in vitro* и *in vivo*.

В окисленном цитохроме С аминокислотная замена T78S/K79P в участке, участвующем в координации иона железа различной валентности, приводит к уменьшению вероятности плоской конформации гема и снижению подвижности пиррольных колец. Вероятно, это является следствием замены положительно заряженной боковой цепи Lys79 на электронейтральную гидрофобную цепь остатка Pro Замена положительного

заряда боковой цепи Lys25 на отрицательный заряд остатка Glu в цитохроме С также вызывает уменьшение подвижности пирролов.

В восстановленном нейроглобине аминокислотная замена E60K, инвертирующая отрицательный заряд боковой цепи Glu60 на положительный Lys60, приводит к снижению вероятности плоской конформации гема и уменьшению подвижности пиррольных колец, что вполне естественно, учитывая близкое расположение аминокислоты в позиции 60 к гему. Показано, что передача электрона от нейроглобина на гем цитохрома С зависит сразу от нескольких параметров: от локальных зарядов гемовой щели, подвижности Ω -петли цитохрома С, вероятности реализации плоской конформации гемов Цит С и Нгб, подвижности пиррольных колец гемов.

Весьма интересной явилась находка того, что рН в межмембранном пространстве митохондрий и разность потенциалов на внутренней митохондриальной мембране, влияют на конформацию гема и, следовательно, на перечисленные выше свойства Цит. С.

Установлено, что замена тирозинов 48 и 97 на глутаматы, имитируя, тем самым, фосфорилированное состояние цитохрома С, снижает вероятность плоской конформации гема, увеличивает вероятность искаженной конформации гема и снижает способность Цит. С акцептировать электрон от комплекса III дыхательной цепи.

В кардиомиоцитах здоровых крыс ускорение митохондриального дыхания с помощью протонофора увеличивает вероятность плоской конформации гема цитохрома С, что способствует ускорению переноса электрона между комплексом III и цитохромом С. В митохондриях крыс с повышенным артериальным давлением подобный методический прием не привел к регистрации изменения конформации гема цитохрома С. Эта находка позволяет, на наш взгляд, по-новому взглянуть на биохимию митохондрий в модели гипертонии.

Установлено, что гипоксическое preconditioning изолированного сердца крысы, приводит к снижению генерации пероксида водорода в митохондриях кардиомиоцитов при последующей длительной гипоксии, за счет предотвращения, по крайней мере отчасти, избыточного окисления цитохромов комплексов III и/или IV дыхательной цепи.

Научная новизна работы

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Жанна Владиславовна впервые провела методом комбинационного рассеяния комплексное исследование взаимодействия белков (цитохрома С и нейроглобина) *in vitro*, внутриклеточных органелл (митохондрий), как в изолированном состоянии,

так и митохондрий и внутри кардиомиоцитов и в изолированных сердцах крысы, причем как в норме, так и при гипоксии. Автор творчески сочетала разнообразные молекулярно-биологические подходы работу с чисто физическими методами спектроскопии комбинационного рассеяния света и флуоресцентной микроскопии. Благодаря такому разностороннему подходу было установлено следующее. Электрон-акцепторная активность цитохрома С определяется конформацией гема, в регуляции которой решающую роль играют локальные заряды поверхностей гемовой щели цитохрома С и белка-донора электрона, жесткость Ω -петли цитохрома С, рН в межмембранном пространстве митохондрий и потенциал на внутренней мембране. Обнаружено, что при патологических состояниях сердца, спонтанной гипертонии и длительной ишемии, нарушается регуляция конформации гема цитохрома С. В результате экспериментов с применением микроспектроскопии комбинационного рассеяния света, которые в условиях *in vivo* были выполнены впервые, обнаружены функциональные различия в работе дыхательной цепи митохондрий кардиомиоцитов здоровых крыс по сравнению с крысами на начальных этапах гипертонии.

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, а также представлены на 4-х 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 надежно подтверждают достоверность полученных результатов.

Замечания и вопросы по диссертации

1. Обзор литературы дает достаточно полное представление о тематике диссертационного исследования, однако, название параграфа 1.1.2 «Структура гема В нейроглобина и его функциональная активность» не отражает полного содержания этой части Обзора поскольку в ней говорится

и о структуре самого нейроглобина и его функциональной роли. Восприятие этого параграфа выиграло бы, если бы автор привела структуру нейроглобина и расположение гема в нем.

2. Стр.70, верхний абзац. Очевидно, пропущен знак равенства в выражении ($S^A S^B$). Не ясно, как получен численный коэффициент 2,865 и чем определяется его точность до 3-х значащих цифр после запятой, что не очень типично для экспериментов на биологических объектах.

3. Стр.83, параграф 2.5.2. «Моделирование условий кислородно-глюкозной депривации...». Не описано каким образом чашку с первичной культурой кардиомиоцитов изолировали от атмосферного кислорода после того, как в нее направляли поток буферного раствора, обескислороженного продуванием азота.

4. В главе «Результаты» или «Заключение» необходимо было обсудить насколько замена остатков тирозина 48 и 97 на остатки глутамата могут имитировать эффект фосфорилирования, учитывая то, что каждая фосфатная группа при физиологических pH несет 2 отрицательных заряда, а не один, как боковая цепь глутамата, и, кроме того, фосфатные группы фосфорилированных тирозилов находятся на большем расстоянии от основной полипептидной цепи по сравнению с карбоксильными группами боковых цепей остатков глутамата.

5. Почему оси ординат КР-спектров Цит C(Fe^{3+}) и Цит C(Fe^{2+}) на Рис. 6а (Стр.87, Рис. 1 в автореферате) имеют шкалу в тысячи единиц, а на Рис. 14 (Стр.100) интенсивность выражена сотых долях?

6. Для выполнения целей диссертационного исследования были сформулированы 3 задачи и на защиту вынесены 3 положения, что вполне логично. В то же время, окончательные Выводы содержат 8 пунктов, которые сформулированы так, что напоминают пересказ разделов Результаты и Заключение. Впечатление о тщательности выполнения работы и объема полученных данных не пострадало бы, если бы Автор исключила детализацию и объединила некоторые пункты Выводов, например, 2-ой и 4-ый.

7. В «Методах» или в «Результатах» внимание следует уделять математической обработке результатов, без которой невозможно извлечь полезную информацию, а также статистической достоверности результатов. Хотя Диссертант уделила внимание этому важнейшему пункту биофизических исследований в подписях к большинству рисунков, но этого недостаточно, особенно в экспериментах *in vivo*.

Заключение

Диссертационная работа Жанны Владиславовны Бочковой 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, проявлением интереса к результатам и не умаляют научную ценность диссертационной работы. Диссертация отвечает требованиям, установленным 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, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бочкова Жанна Владиславовна вполне заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – «Биофизика».

Сурин Александр Михайлович
главный научный сотрудник, доктор биол. наук
Специальность 3.3.3 – Патологическая физиология

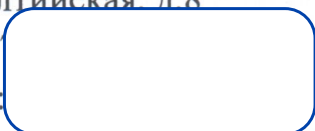


10.02.2025

Место работы: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Отдел общей патофизиологии, Лаборатория фундаментальных и прикладных проблем боли.

125315, Москва,
ул. Балтийская д. 8

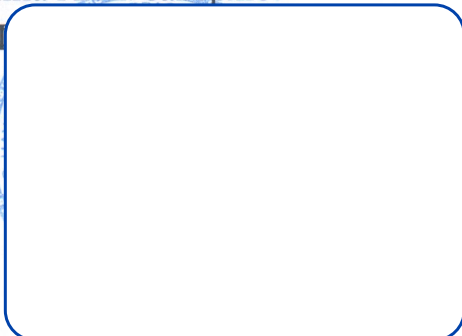
Тел: +
e-mail:



Подпись д.б.н. Сурина А.М. заверяю:

Ученый секретарь Ф

К.М.Н.



Е.Н. Кожевникова