

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. Одна из важнейших проблем современной биологической науки – исследование свойств биологических макромолекул внутри клетки, в условиях так называемого «молекулярного краудинга». Это условия, характерные для цитоплазмы, когда концентрация белковых молекул в сотни раз превышает их концентрацию в растворах, обычно используемых для изучения свойств биологических молекул *in vitro*. Кроме того, в гелеобразном цитозоле диффузия молекул может быть затруднена, поэтому его состав и структура белков в разных отделах клетки могут различаться, при высоких концентрациях белковые молекулы способны образовывать ассоциаты (олигомеры), что изменяет их функциональные свойства.

Хорошей моделью для исследования реальных свойств биологических молекул в клетке являются эритроциты человека. С одной стороны, они лишены ядер и мембранных органоидов и заполнены в основном молекулами гемоглобина. С другой стороны, данные, полученные при их исследовании, могут быть использованы в медицинской практике для постановки диагноза, особенно при широко распространенном синдроме анемии. И, наконец, именно биофизические методы, в частности, Рамановская спектроскопия, позволяют исследовать свойства макромолекул в клетках без их разрушения. Таким образом, **исследование, проведенное Слатинской О.В актуально, а поставленная в этом исследовании цель, а именно: сравнение конформации гемоглобина в эритроцитах с таковым в растворе и распределение белка внутри эритроцита в различных условиях может быть достигнута с использованием биофизических методов.**

Невзирая на длительное изучение свойств гемоглобина как молекулы, **работа Слатинской Ольги Вадимовны без сомнения обладает новизной**, поскольку в ней исследуются конформационные особенности не только гема, но и белковой части молекулы, находящейся не в растворе, а в самом эритроците при изменении физиологических параметров. Результаты работы ясно демонстрируют, что свойства молекулы гемоглобина в эритроците и его распределение там отличаются от свойств гемоглобина в растворе. степень обоснованности. Необходимо также отметить, что **степень обоснованности положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений**.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа Слатинской Ольги Вадимовны (объем рукописи 253 страницы) написана по классическому варианту, содержит соответствующие главы, а именно: введение, обзор литературы, описание объектов, материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы, содержащий 400 источников. Работа иллюстрирована 87 рисунками и 13 таблицами.

Глава «**Введение**» посвящена описанию состояния проблемы, в ней описаны цели и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, научная и практическая значимость работы, личный вклад автора, а также связь с плановыми работами и возможность внедрения результатов работы. В конце главы приведены благодарности.

Обзор литературы содержит всю информацию, необходимую для понимания результатов работы. В нем приведены данные о строении и функциях эритроцита и его основного белка гемоглобина, дано определение молекулярного краудинга, описано функционирование эритроцита в процессе его переноса кровью, влияние ионов Са и изменения объема эритроцита на свойства клетки и гемоглобина. В целом обзор дает представление о современном состоянии знаний в области исследования и подготавливает читателя к пониманию стоящих перед диссертантом задач. Цель работы заключается в сравнительном исследовании конформации гема

и белковой части молекулы гемоглобина в цитоплазме эритроцита по сравнению с раствором гемоглобина при изменении таких физиологических параметров как парциальное давление кислорода, температура, ζ -потенциал плазматической мембраны эритроцита, а также объема клетки и изменение в ней соотношения ионов Na и K.

В следующей главе «**Материалы и методы**» описаны объекты и материалы исследования. Следует отметить, что диссертант использовал в работе большой арсенал биофизических методов: это спектроскопия комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния, определение поверхностного потенциала эритроцитов, инфракрасная спектроскопия, поляризационная спектроскопия комбинационного рассеяния, лазерная интерференционная спектроскопия и томография на основе этого метода, атомно-абсорбционная спектрометрия, пикосекундная флуоресценция триптофана, динамическое светорассеяние. Методы хорошо описаны, даны теоретические основы этих методов и обоснование их использования. Уже это свидетельствует о высоком профессиональном мастерстве диссертанта и о соответствии работы паспорту специальности.

В главе «**Результаты**» автор последовательно излагает полученные результаты. Диссертантом установлено, что в условиях гипоксии (снижение парциального давления кислорода в суспензии эритроцитов до 2 мм рт.ст.) в эритроците повышается вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации и глобина в конформации с более высокой плотностью упаковки белка.

При повышении температуры от 20 до 42 °C выявлено увеличение ζ -потенциала и снижение плотности упаковки глобина молекулы гемоглобина, а также увеличение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации и выявлено перераспределение молекул гемоглобина из центральной области к внутренней поверхности плазматической мембраны. Далее показано, что распределение гемоглобина в цитоплазме неоднородно и изменяется при различных состояниях эритроцита: увеличение ζ -потенциала

клетки вызывает перераспределение молекул гемоглобина в цитоплазме, а именно: увеличивается содержание молекул гемоглобина с одновременным ростом плотности упаковки глобина. С использованием ИК- и КР-спектроскопии диссертантом показано, Увеличение ζ -потенциала эритроцита при снижении внеклеточной концентрации Ca^{2+} происходит перераспределение молекул гемоглобина из центральной области цитоплазмы к краю клетки, а также возрастает вероятность нахождения гема в «куполообразной» конформации и снижается плотность упаковки молекулы глобина.

Диссертантом убедительно показано, что изменения конформации гема и плотность упаковки молекулы глобина, а также гетерогенность его распределения в цитоплазме эритроцита влияют на способность гемоглобина связывать и переносить кислород. И наконец, при исследовании конформации гемоглобина в эритроцитах больных с диагнозом идиопатическая легочная гипертензия диссертантом были выявлены особенности эритроцитов и конформаций гемоглобина, влияющих на способность переносить кислород, что позволит уточнять диагноз этого заболевания на основе КР-спектроскопии. **На основе этих исследований был получен патент, что свидетельствует о важном практическом значении исследования.**

В «**Заключении**» автор суммирует полученные им данные и приводит схему, описывающую изменение конформации гемоглобина и расположения его молекул в цитоплазме эритроцита при прохождении по кровеносному руслу, которая логично объединяет полученные данные.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Невзирая на положительную оценку работы к ней есть ряд замечаний.

1. Автор заключает, что причиной изменения конформации гемоглобина, наблюдаемого при снижении внеклеточной концентрации Ca^{2+}

(увеличение вероятности нахождения гема в «куполообразной» конформации и снижение плотности упаковки глобина) является изменение ζ -потенциала мембраны эритроцита. Однако снижение внеклеточной концентрации Ca^{2+} до 1 мкМ (кстати, такая концентрация никогда не бывает в плазме крови) может приводить и к другим последствиям, в частности, к изменению активности транспортеров плазматической мембраны и увеличению входа воды. Это в свою очередь может влиять и на конформацию гемоглобина.

2. При увеличении соотношения внутриклеточных концентраций Na^+ / K^+ также происходит увеличение ζ -потенциала, возрастает вероятность «куполообразной» конформации гема и меняется плотность упаковки глобина. Автор считает, что это обусловлено именно изменением потенциала. Однако изменение соотношения концентраций Na^+ / K^+ также может влиять на транспортные системы плазматических мембран и увеличивать вход воды в клетку, что может сказаться и на конформации гемоглобина. Второе объяснение автором обнаруженного явления заключается в том, что при повышении внутриклеточной концентрации Na^+ этот катион связывается с отрицательно заряженными группами гемоглобина и влияет на его конформацию. Такое объяснение кажется маловероятным, поскольку увеличение концентрации Na^+ происходит на фоне высоких концентраций K^+ (его концентрация в клетке более 100 мМ), а избирательности в связывании Na^+ и K^+ у гемоглобина нет.

3. При изменении концентрации ионов внеклеточного Ca^{2+} автор не учитывал, что Ca^{2+} может попасть в раствор с примесями других реактивов. При низких концентрациях Ca^{2+} (10^{-6} М) это может существенно изменить концентрацию иона.

4. В тексте очень много сокращений, которых нет в списке сокращений, что затрудняет чтение диссертации.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

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 биологических наук,
Ведущий научный сотрудник, руководитель группы кафедры биохимии
Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
«Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

ЛОПИНА Ольга Дмитриевна



27 июня 2023 г.

Контактные данные:

тел.: +7-495-939-3955, e-mail: info@mail.bio.msu.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.00.04 – Биохимия

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии
Тел.: +7-495-939-3955; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Ученый секретарь



Е.В. Петрова