

**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.** Диссертационная работа Бочковой Жанны Владиславовны представляет собой исследование регуляции важного биологического процесса: потока электронов в дыхательной цепи млекопитающих в норме, при окислительном стрессе, а также и при некоторых патологиях, характерных для человека, а именно: гипертонической болезни, ишемии и реперфузии. Дыхательная или электрон-транспортующая цепь (ЭТЦ) представляет собой встроенную во внутреннюю мембрану митохондрий систему транспорта электронов от окислительно-восстановительных эквивалентов (НАДН и ФАДН<sub>2</sub>) к кислороду. Энергия этого потока электронов тратится на создание градиента протонов на мембране, который, в свою очередь, служит источником энергии для синтеза АТФ, используемого в качестве основной энергетической валюты в живых организмах.

ЭТЦ представлена 4 белковыми мембранными комплексами, содержащими небелковые кофакторы, непосредственно участвующие в процессе переноса электронов. Лишь один из переносчиков электронов ЭТЦ, а именно цитохром *c*, содержащий гем в качестве кофактора, непосредственно связывающего электроны, представляет собой растворимый белок, локализованный между внутренней и внешней мембраной митохондрий и осуществляющий перенос электронов с комплекса III на комплекс IV. Этот процесс является наиболее медленным и лимитирует скорость переноса электронов по ЭТЦ.

В случае замедления процесса транспорта электронов от цитохрома С к комплексу IV, возможна утечка электронов в комплексах I-III, что приводит к продукции супероксид-анион радикала и возникновению окислительного стресса, грозящего появлением различных патологий. Помимо этого, при развитии патологических процессов цитохром С способен выходить в цитоплазму и инициировать смерть клетки по пути апоптоза. Этот процесс тормозится за счет взаимодействия цитохрома С с гемопротеином нейроглобином, локализованным в цитоплазме. Передача электронов от цитохрома С, в свою очередь, зависит от конформации гема. В последние годы установлено, что гемы, входящие в состав гемопротеидов, способны принимать различные виды неплоскостной конформации, что сказывается на функциональной активности гемопротеинов и на биологических процессах, происходящих с их участием. **В связи с этим исследование, проведенное Бочковой Ж.В., цель которого сформулирована как «Исследование изменения конформации гема цитохрома С при его функционировании в зависимости от микро- и макроокружения, а также состояния цитохромов С и В в норме и при патологии в условиях *in vitro* и *in vivo*» является, безусловно, актуальным, а полученные диссертантом данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.**

**Структура диссертационной работы.** Диссертационная работа Жанны Владиславовны Бочковой построена по классическому образцу и состоит из разделов, включающих «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», а также содержит разделы «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», включающий 152 ссылки. Работа иллюстрирована 35 рисунками, а также содержит 5 таблиц. Текст диссертационной работы изложен на 167 страницах.

Во **«Введении»** Бочковой Ж.В. описана актуальность исследования, сформулированы цель и задачи работы, положения, выносимые на защиту, научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость работы, приведены данные о методологии и методах исследования, апробации

результатов и данные о публикациях (6 статей в рецензируемых научных изданиях).

В «Обзоре литературы» диссертационной работы приведена информация о разнообразии гемопротеинов и дана классификация различных гемов в соответствии с их структурой, подробно описаны структура гема С, входящего в состав цитохрома С, и его универсальный сайт связывания, представляющий собой положительно заряженную контактную поверхность вокруг гемового кармана, участвующую во взаимодействии с разнообразными партнерами, включая гем-содержащие белки и кардиолипиды митохондриальной мембраны. Далее дана информация о различных внеплоских конформациях порфиринового цикла, их функциональном значении и влиянии на редокс-потенциалов гемопротеинов.

Затем рассмотрены методы комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) и их применение для исследования конформаций различных гемов в составе гемопротеинов. Особое впечатление производит таблица 1, составленная автором на основе анализа публикаций, в которой описаны основные колебательные моды окисленных и восстановленных гемов С и В с данными о положениях пиков на спектре, а также таблица 2 с информацией о положениях пиков на спектрах гигантского комбинационного рассеяния для цитохрома С, миоглобина, митохондрий, кардиомиоцитов и сердца крысы. Представленная в таблицах информация существенно облегчает понимание представленных данных.

Диссертант подробно описывает дыхательную цепь митохондрий с характеристикой отдельных комплексов дыхательной цепи и две модели их расположения и функционирования, а также регуляция работы ЭТЦ и роли цитохрома С в этом процессе. Обзор литературы написан хорошим языком, приведенная и проанализированная диссертантом совокупность данных литературы позволяет понять полученные Ж.В. Бочковой результаты и оценить ее вклад в развитие проблемы регуляции системы переноса электронов в митохондриях.

В разделе **«Материалы и методы»** диссертант подробно описывает использованные в работе методы, среди которых получение рекомбинантных нормальных и мутантных форм цитохрома С и нейрогобина, регистрация и обработка данных, полученных методами КР и ГКР (включая описание способов приготовления наноструктур), описание метода регистрации редокс-реакции между цитохромом С и нейрогобином. Кроме того, описаны методы регистрации конформационных изменений гема цитохрома С и активности ЭТЦ в интактных митохондриях крыс контрольной (WKY) и спонтанно гипертензивной линии (SHR), а также методология КР спектроскопии в интактных сердцах крыс, мониторинг уровня синтеза  $H_2O_2$  в условиях кислородно-глюкозной депривации и последующей реперфузии. Методическая часть работы изложена так, что позволяет воспроизвести проведенные автором эксперименты. В целом этот раздел совместно с разделом, где приведены полученные автором экспериментальные данные, демонстрирует высокий уровень квалификации Бочковой Ж.В. в области биофизики и молекулярной биологии.

Раздел **«Результаты и обсуждение»** представляет наибольший интерес, поскольку в нем представлены основные достижения рецензируемой работы. Сначала автор проводит сравнение спектров КР и ГКР окисленных и восстановленных форм цитохрома С и нейрогобина, которые фактически представляют собой спектры содержащихся в них гемов С и гемов В. Полученные данные демонстрируют, что конформация гема в значительной степени определяется белковой частью молекул гемопротеинов. Так, в окисленном цитохроме С замены T78S и K79P в области  $\Omega$ -петли, вовлеченной в координацию атома железа гема, уменьшает подвижность пиррольных колец, повышая вероятность существования плоской конформации гема, как и замена K25E в области сайта связывания с партнерами. В восстановленном нейрогобине замена E60K в области сайта связывания также снижает вероятность существования плоской конформации. Процесс передачи электрона к цитохрому С от нейрогобина определяется

несколькими факторами белковой части молекулы: локальным зарядом на поверхности щели для гема, подвижностью  $\Omega$ -петли, вероятностью существования плоской конформации гема и подвижностью его пиррольных колец.

Кроме того, автором установлено, что среда, в которой находится окисленный цитохром С, также оказывает влияние на конформацию его гема: защелачивание среды (с 6,6 до 7,6), введение протонофора СССР, устраняющего градиент рН на внутренней мембране митохондрии, или ионофора валиномицина увеличивает вероятность существования плоской конформации гема, тогда как ингибитор АТФ-синтетазы олигомицин, напротив, снижает вероятность существования такой конформации.

При исследовании процессов регуляции конформации гема под действием фосфорилирования, которое имитировали заменой тирозина на глутамат в положениях 48 и 97 (места возможного фосфорилирования цитохрома под действием тирозиновых протекиназ), было обнаружено снижение вероятности существования плоской конформации гема.

Несомненным достоинством проведенного диссертантом исследования является информация о состоянии гема гемопroteинов в нативных митохондриях кардиомиоцитов. Обнаружено, что в условиях активации дыхания возрастает вероятность существования плоской конформации цитохрома С, что увеличивает скорость переноса электронов между комплексом III и цитохромом С. В митохондриях крыс с повышенным артериальным давлением условия, обеспечивающие активацию дыхания, не приводит к изменению конформации цитохрома С, что свидетельствует о потере механизма, обеспечивающего регуляцию транспорта электрона в ЭТЦ. В свою очередь гипоксическое прекондиционирование, проведенное перед длительной гипоксией, уменьшает генерацию перекиси водорода и предотвращает окисление цитохромов дыхательной цепи и увеличивает вероятность плоской конформации гема в ходе последующей реперфузии. Таким образом, диссертантом четко показано, что эффективность

функционирования цитохрома С в значительной степени зависит от конформации его гема, которая, в свою очередь определяется структурой белковой части гемопротейна и микроокружением белка.

Диссертационная работа Бочковой Жанны Владиславовны представляет собой хорошо спланированное, тщательно выполненное исследование, свидетельствующее о высокой квалификации автора. Невзирая на высокую оценку этой работы к автору есть ряд вопросов и замечаний.

### **Вопросы.**

При чтении диссертации возник только один существенный вопрос. В таблице 1 указаны характерные пики для гема С в окисленном и восстановленном состоянии: 1371 и 1365  $\text{см}^{-1}$ . Подразумевается, что эти различия являются существенными (6  $\text{см}^{-1}$ ). На рисунке 14а, где представлены разностные спектры при окислении НАДФН окисленной и восстановленной формы нейроглобина в присутствии цитохрома С: различия составляют 4  $\text{см}^{-1}$  (610 и 614  $\text{см}^{-1}$ ), но они не рассматриваются как существенные. Почему?

### **Минорные замечания.**

К сожалению, в работе встречаются некоторые опечатки, которые приводят к получению читателем неверной информации.

1. Например, на стр. 45 указано, что окислительно-восстановительный потенциал НАДН составляет -32 В, хотя эта величина равна -0,32 В.
2. Качество рисунков можно было бы улучшить, если бы их размер был увеличен. В некоторых случаях на рисунке невозможно увидеть пунктирные или обозначенные каким-либо цветом линии, что затрудняет понимание.
3. При написании текста на русском языке в десятичных дробях 0 отделяется от десятых долей запятой, а не точкой: 0,35, а не 0.35
4. К сожалению, автор не дал определения туннельного механизма переноса электронов.
5. Непонятно, почему цитохром С в тексте пишется с заглавной буквы (Цитохром С)

В заключении необходимо отметить, что диссертационная работа Бочковой Жанны Владиславовны соответствует специальности 1.5.2. «Биофизика», а именно следующим ее направлениям: биофизика клетки. 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 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

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

Официальный оппонент:

Профессор, доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник группы кафедры  
биохимии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Лопина Ольга Дмитриевна

10 февраля 2025 года

Контактные данные:

тел.: 7(495)939-44-34, e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы:

119234, РФ г. Москва, ул. 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)939-44-34; e-mail: od\_lopina@mail.ru