

## Отзыв

на автореферат диссертационной работы **Степановой Анастасии Евгеньевны** «Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности

1.5.2 – биофизика

В настоящее время большое внимание уделяется изучению способности свободных жирных кислот и их метаболитов индуцировать неспецифическую проницаемость липидных мембран, как биологических, так и искусственных. В диссертационной работе Степановой Анастасией Евгеньевной рассматриваются механизмы действия пальмитиновой кислоты и продуктов ее  $\omega$ -окисления на мембраны эритроцитов, митохондрий, а также липосом.

В ходе работы автором продемонстрирована возможность существования общего механизма действия продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты ( $\omega$ -гидроксипальмитиновой и  $\alpha,\omega$ -гексадекандикарбоновой кислот) на изученные объекты. Показано, что обе эти кислоты способны индуцировать агрегацию мембран, которая сопровождается нарушением их целостности, а необходимым условием их воздействия является наличие в модельной системе ионов кальция или других двухвалентных металлов.

В своей работе Степанова А.Е. использует как известные классические, так и достаточно современные биофизические методы, которые адекватны поставленным в работе задачам. Несомненно, что помимо фундаментального значения для биофизики и мембранологии, представленные результаты, в перспективе, могут иметь и научно-практическое применение в биомедицине с целью направленной регуляции проницаемости мембран клеток и их органелл, а также искусственных липидных систем.

Тем не менее, имеется небольшое замечание к содержанию работы. При обсуждении результатов автору следует привести известные данные о коэффициентах распределения изучаемых жирных кислот, что позволит лучше понять механизмы их действия и охарактеризовать выявленные различия в эффективности.

В целом, диссертационная работа Степановой Анастасии Евгеньевны на тему «Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных

мембран продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а её автор – Степанова Анастасия Евгеньевна – заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 - Биофизика.

Доктор биологических наук, профессор, медико-биологический факультет, кафедра биофизики и биотехнологии, заведующий

Артюхов Валерий Григорьевич

Доктор биологических наук, медико-биологический факультет, кафедра биофизики и биотехнологии, доцент

Антипов Сергей Сергеевич

Воронежский государственный университет,  
394018, Воронежская область, г. Воронеж, ул. Университетская площадь, д. 1  
Телефон: +7 (473)2208981,  
Адрес электронной почты: artjukhov@bio.vsu.ru



федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)	
Подпись	Артюхов В. Г. Антипова С. С.
Завверяю	специалист по УМР Тумская И. Ю.
	13.05.2022
подпись, расшифровка подписи	

## ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

диссертационной работы Степановой Анастасии Евгеньевны «Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика

Судя по автореферату диссертации представленная работа Степановой А.Е. является актуальной, поскольку затрагивает одну из важнейших проблем в изучении молекулярных механизмов индукции неспецифической проницаемости липидных мембран. Достаточно давно известно, что эффективными природными индукторами неспецифической проницаемости мембран клеток и их органелл являются свободные монокарбоновые жирные кислоты, например, пальмитиновая жирная кислота. В то же время практически ничего не известно о влиянии продуктов ее  $\omega$ -окисления ( $\omega$ -гидроксипальмитиновой (ГПК) и  $\omega$ -гексадекандикарбоновой (ГДК) кислот) на проницаемость липидных мембран. Настоящая работа восполняет этот пробел.

Цель и задачи диссертационного исследования сформулированы грамотно, четко и вытекают из актуальности проблемы. Степановой А.Е. впервые установлено, что ГПК и ГДК способны индуцировать в присутствии ионов кальция проницаемость («пермеабиллизацию») мембран эритроцитов, митохондрий и липосом. В результате проведенных исследований диссертант делает вывод о наличии универсального механизма действия данных кислот на липидные мембраны. Выявлены основные условия, необходимые для проявления пермеабиллизующего действия изучаемых жирных кислот на митохондрии печени крыс. Степановой А.Е. выяснено, что действие ГПК и ГДК в случае митохондрий сопровождается выбросом из этих органелл проапоптотического белка цитохрома c, что свидетельствует о возможно участии этого феномена в индукции клеточной смерти. На основании этого диссертантом разумно предположено, что накопление продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты в клетках печени может рассматриваться как один из факторов их гибели.

Стоит отметить использование Степановой А.Е. целого ряда современных биофизических методов исследования, позволивших довольно прилично изучить данный феномен. В целом, сделанные в работе выводы достаточно обоснованы, а полученные Степановой А.Е. научные результаты имеют фундаментальное значение для биологических наук. Материалы, представленные в автореферате, полно отражены в публикациях, в том числе в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Имеются небольшие замечания к автору, не влияющие на смысловую часть работы. В разделе 3.1., описывающем специфичность действия ГДК на проницаемость мембран митохондрий, выделенных из различных органов, упоминается о различии в липидном и белковом составе мембран органелл. Однако в этом случае автор отсылает читателя к данным литературы. Было бы гораздо убедительнее, если бы автор предоставил экспериментальные данные, описывающие эти различия. Качество некоторых рисунков нуждается в улучшении. В частности, рис. 3, отражающий агрегацию митохондрий печени в суспензии – единичные митохондрии на панели А практически не видны. Данные в Таблице 1 представлены не удачно, на мой взгляд лучше отказаться от тысячных дробей, а выразить результат целыми числами заменив «мг» на «г».

Полученные результаты достоверны, отличаются новизной и научно-практической значимостью. Выводы и положения выносимые на защиту, соответствуют полученным автором результатам, основные результаты работы опубликованы в статьях в рецензируемых научных журналах и обсуждены на научных конференциях. Объем, качество и актуальность выполненных исследований соответствуют требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., №842 (с изменениями от 11.09.2021), а ее автор, Степанова Анастасия Евгеньевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

24.05.2022 г.

д.б.н., доцент, 03.01.02 – биофизика

Профессор РАН

Руководитель центра биофотоники

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

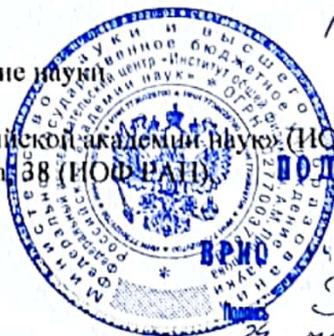
Федеральный исследовательский центр

«Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» (ИОФ РАН)

Контактные данные: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 38 (ИОФ РАН)

+7-915-153-0850, s\_makariy@rambler.ru

Гудков Сергей Владимирович



ПОДПИСЬ

ЗАБЕРЯЮ

Гудкова С.В.

ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЕКРЕТАРИАТА ИОФ РАН

Глушков В.В.

## Отзыв

на автореферат диссертации Степановой Анастасии Евгеньевны «Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами ω-окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика

Диссертационная работа А.Е. Степановой посвящена изучению феномена кальций-зависимой проницаемости биологических и искусственных мембран, индуцированной продуктами ω-окисления пальмитиновой кислоты. Важность данного исследования не вызывает сомнений, так как известно, что при ряде патологических состояний, связанных с нарушением липидного обмена, наблюдается повышение уровня изучаемых жирных кислот в сыворотке крови и клетках печени больных.

В результате проведенных исследований автором выяснено, что ω-метаболиты пальмитиновой кислоты способны в присутствии ионов двухвалентных металлов индуцировать агрегацию искусственной мембраны липосом, а также биологических мембран клеток и митохондрий, которая приводит к их неспецифической проницаемости. В случае митохондрий автором проведено масштабное исследование, которое включило в себя выяснение необходимых условий действия жирных кислот, оценку особенностей проявления этого феномена в митохондриях, выделенных из различных тканей, а также печени животных различного возраста. Выявлено, что митохондрии сердца характеризуются повышенной устойчивостью к развитию этого процесса, что, возможно, связано с особенностями состава мембран этих органелл. Кроме того, установлено, что влияние изучаемых жирных кислот увеличивается с возрастом животных. Достаточно убедительно показана универсальность этого феномена.

Основные положения работы прошли апробацию на конференциях и симпозиумах различного уровня. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в авторитетных отечественных и зарубежных рецензируемых журналах.

Несмотря на высокий уровень работы, при ознакомлении с авторефератом диссертации возникли ряд вопросов, а именно:

1) в качестве задачи №3 Степанова А.Е. указывает: «Определить основные условия, необходимые для проявления Ca<sup>2+</sup>-зависимых эффектов ГПК и ГДК на митохондриях клеток печени». Однако, автором в разделе «Материалы и методы» указано, что для исследования брали целый орган, но не клеточную культуру. В таком случае следует говорить о митохондриях печени, это общепотребимый термин.

2) в разделе 4, озаглавленном как «Индукция ГПК и ГДК  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой агрегации и пермеабиллизации липосом», автор указывает параметр z-average, хотя дальше по тексту на рисунке 9Б и подписях к нему указывает параметр «z-среднее». Автору следует придерживаться единого стиля.

Тем не менее, анализ автореферата диссертационного исследования Анастасии Евгеньевны Степановой позволяет заключить, что оно является самостоятельной, законченной научно-исследовательской работой. Материалы диссертационного исследования достаточно полно представлены в научных изданиях. По актуальности, научной новизне и практической значимости работа соответствует всем требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., №842 (с изменениями, внесенными постановлением Правительства Российской Федерации от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.2 – биофизика.

13.05.2022 г.

Отзыв предоставила:

Галина Дмитриевна Миронова



д.б.н. (03.00.02 – биофизика), профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующая лабораторией митохондриального транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Россия, г. Пущино, ул. Институтская, 3, 142290

Тел. +7(4967) 73-09-59

e-mail: mironova40@mail.ru



Подпись: *Мироновой Г.Д.*

УДОСТОВЕРЯЮ-ЗАВ. ОДОУ  
О.В. СЕНОТОВА



## ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации Степановой Анастасии Евгеньевны «Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами ω-окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика**

В настоящее время одним из перспективных направлений биофизики является исследование механизмов взаимодействия природных и синтетических агентов с биологическими и искусственными липидными мембранами. В этом аспекте интерес представляют свободные жирные кислоты разной структуры, а также их продукты окисления, способные индуцировать неспецифическую проницаемость липидного бислоя биологических и искусственных мембран в присутствии ионов двухвалентных металлов (прежде всего, кальция).

Диссертационная работа Степановой А.Е. «Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами ω-окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки» посвящена изучению механизмов влияния продуктов ω-производных пальмитиновой кислоты, обладающей физиологической значимостью, на поведение липидного бислоя мембран в присутствии ионов кальция. Рецензируемая научно-квалификационная работа содержит решение задачи глубокого изучения механизмов взаимодействия продуктов окисления жирных кислот с липидными мембранами, имеющей значение для развития биофизики липидных мембран, патофизиологии и медицины. Исходя из этого, диссертация Степановой А.Е. имеет несомненную актуальность.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в проведении комплексного исследования действия метаболитов ω-окисления пальмитиновой кислоты (ω-гидроксипальмитиновой и α, ω-гексадекандикарбоной кислот) как индукторов Ca<sup>2+</sup>-зависимой агрегации и пермеабиллизации липидного бислоя мембран эритроцитов и мембран митохондрий. В ходе работы были выявлены тканевые и возрастные особенности действия этих кислот на внутреннюю мембрану митохондрий. Наблюдаемые автором эффекты позволили предположить, что накопление метаболитов ω-окисления пальмитиновой кислоты в клетках и в органеллах может приводить к их гибели. Часть работы, выполненная на лецитиновых липосомах, позволила диссертанту выдвинуть гипотезу о наличии общего механизма действия исследуемых кислот на липидные мембраны.

На основании объемного экспериментального материала, комплекса биофизических методов исследования, выводов, данную диссертационную работу можно считать законченным научным исследованием. Результаты исследований апробированы на международных и российских конференциях, опубликованы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

В качестве замечания хотелось бы отметить, что таблицу 1, в которой приведены значения скоростей набухания митохондрий печени крыс разного возраста, стоило бы

перевести в графический вид, это позволит легче интерпретировать полученные данные. Указанный недостаток не снижает общего положительного впечатления от автореферата диссертационной работы.

Считаю, что по актуальности, научной новизне и практической значимости, представленная диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 №842 в ред. от 20.03.2021 г.), предъявляемым ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Степанова Анастасия Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Кандидат химических наук  
(1.4.4. Физическая химия),  
ассистент кафедры технологии  
косметических средств  
федерального государственного  
бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Казанский национальный  
исследовательский  
технологический университет»

Рыбакова Алёна Ивановна

31.05.2022

420015 г. Казань, ул. К. Маркса, д.68  
[alenarybakova1994@mail.ru](mailto:alenarybakova1994@mail.ru), +7(843)231-89-30

Согласна на обработку персональных данных, включения их в аттестационное дело соискателя и вывешивания отзыва на сайте ФИЦ КазНЦ РАН.



## ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Степановой Анастасии Евгеньевны  
**«Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки»,**  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности  
1.5.2 – биофизика

В последние годы во всем мире наблюдается устойчивый рост больных с нарушениями липидного обмена, такими как ожирение и сахарный диабет. Хорошо известно, что такие нарушения сопровождаются повышением уровня свободных жирных кислот. Это, в ряде случаев, может активировать экзотические пути их метаболизма, в том числе,  $\omega$ -окисление, приводящее к образованию различных продуктов, оказывающих эффекты на упаковку фосфолипидов мембран. Диссертация Степановой А.Е. посвящена исследованию механизмов агрегации липидных мембран с последующей индукцией их проницаемости в присутствии одной из преобладающих в организме жирных кислот – пальмитиновой кислоты и продуктов ее  $\omega$ -окисления ( $\omega$ -гидроксипальмитиновой и  $\alpha,\omega$ -гексадекандекарбоновой кислот). Для решения поставленных задач диссертантом успешно использован ряд современных биофизических методов исследования.

Диссертация представляет собой завершенное экспериментальное исследование, содержащее достаточное количество оригинальных данных. Результаты исследования достаточно полно изложены в автореферате, написанном хорошим научным языком, и полностью отражены в выводах. Автором впервые показано, что индукция агрегации мембран указанными жирными кислотами приводит к нарушению упаковки фосфолипидов мембран и высвобождению содержимого, как из клеток, так и из органелл (митохондрий). Более того, Степановой А.Е. показано, что подобные эффекты наблюдались и на лецитиновых липосомах, что доказывает наличие универсального механизма действия этих жирных кислот на липидные мембраны.

Работа Степановой А.Е. имеет фундаментальное значение для науки о мембранах, биофизики и физиологии клетки. Диссертация и автореферат Степановой Анастасии Евгеньевны соответствуют требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 и предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а её автор – Степанова Анастасия Евгеньевна – заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

13.05.2022 г.

Отзыв предоставил:

Воденеев Владимир Анатольевич

доктор биологических наук (03.00.02 – биофизика; 03.00.12 – физиология и биохимия растений),  
доцент, заведующий кафедрой биофизики Федерального государственного автономного  
образовательного учреждения высшего образования "Национальный исследовательский  
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1

Тел: +79103883799

e-mail: v.vodeneev@ibbm.unn.ru

