



**МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
(МГУ)**

Ленинские горы, Москва,  
ГСП-1, 119991  
Телефон: 939-10-00  
Факс: 939-01-26

18.05.2022 № 373-22/013-03  
На № \_\_\_\_\_

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Проректор МГУ имени М.В. Ломоносова,  
доктор физико-математических наук, профессор



Федоткин Андрей Анатольевич

« 18 » \_\_\_\_\_ 2022 г.

**ОТЗЫВ**

Ведущей организации на диссертационную работу Степановой Анастасии Евгеньевны « $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Диссертационная работа А.Е. Степановой посвящена исследованию влияния продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты –  $\omega$ -гидроксиальдегидной и  $\alpha, \omega$ -гексадекандикарбоновой кислот, на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую проницаемость биологических и искусственных мембран, выяснению путей регуляции этого процесса и оценке возможной роли этого феномена в развитии патологических состояний.

**Актуальность избранной темы**

Длинноцепочечные жирные кислоты играют важную структурную и функциональную роль в эукариотических клетках. С одной стороны, они используются в качестве энергетических субстратов, а с другой стороны, входят в состав липидов клеточных мембран и мембран органелл. Небольшой пул этих соединений представлен свободными жирными кислотами, которые в зависимости от структуры и концентрации оказывают разнообразное влияние на мембраны, включая детергентное, ионофорное (в том числе, протонифорное) действие, а также влияют на фазовое состояние липидов мембран. Большое внимание уделяется способности свободных жирных кислот

индуцировать неспецифическую проницаемость липидного бислоя биологических и искусственных мембран в присутствии ионов двухвалентных металлов, прежде всего, кальция. К настоящему времени достаточно хорошо изучена индуцируемая предельными монокарбоновыми жирными кислотами и, в частности, пальмитиновой кислотой,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая пора, образующаяся вследствие ламеллярного фазового перехода в липидной мембране. Хотя есть фрагментарные данные о влиянии продуктов  $\omega$ -окисления свободных жирных кислот, а именно, длинноцепочечных  $\alpha, \omega$ -дикарбоновых кислот на кальций-зависимую проницаемость липидных мембран, молекулярные механизмы индукции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации липидных мембран продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот изучены недостаточно. Действительно, ничего не известно о влиянии относительно стабильных промежуточных продуктов  $\omega$ -окисления ( $\omega$ -гидроксикарбоновых кислот) на проницаемость мембран, как и о тканевой специфичности и возрастной зависимости эффектов этих кислот. Известно, что в нормальных условиях содержание этих метаболитов в клетке крайне мало, тогда как при ряде специфических патологий липидного обмена, таких как синдром Рея, синдром Зельвегера, а также неалкогольная жировая болезнь печени происходит существенное повышение уровня продуктов  $\omega$ -окисления свободных жирных кислот в сыворотке и клетках печени. Учитывая вышеуказанное, а также фундаментальную важность всестороннего понимания путей регуляции проницаемости мембран, глубокое исследование механизмов взаимодействия продуктов  $\omega$ -окисления жирных кислот с липидными мембранами, проведенное в данной работе, представляется весьма актуальным.

#### **Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Научные положения, сформулированные Степановой А.Е., полностью обоснованы, достоверны и логически вытекают из результатов проведенного исследования и полноценно их отражают. Выводы, сделанные на основании анализа полученных результатов, основаны на большом объеме фактического материала с высокой статистической мощностью выборок. В работе использовались соответствующие поставленным целям и задачам классические экспериментальные биофизические методы, а также адекватные методы статистической обработки полученных данных.

#### **Научная новизна и научно-практическая значимость работы**

Научная новизна полученных данных не вызывает сомнения. Использование комплекса биофизических методов позволило впервые провести комплексное изучение

феномена  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой агрегации и пермеабилзации мембран, индуцированной продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот.

Автором впервые продемонстрировано, что продукты  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты,  $\omega$ -гидроксипальмитиновая (ГПК) и  $\alpha,\omega$ -гексадекандиовая кислоты (ГДК), способны в присутствии ионов кальция индуцировать агрегацию эритроцитов, которая сопровождается нарушением проницаемости мембран и выбросом содержимого цитоплазмы, частности, ионов калия. Показано, что в отличие от пальмитиновой кислоты, такой эффект ГПК и ГДК не устраняется при инкубации эритроцитов в среде, содержащей альбумин, который способен связывать жирные кислоты. Автор выдвигает предположение, что такие различия в эффекте альбумина обусловлены его меньшим сродством к дикарбоновым кислотам, чем к монокарбоновым аналогам. Аналогичная картина наблюдается и в случае митохондрий сердца и почек крыс. Автором предположено, что эти различия обусловлены разным липидным и белковым составом мембран митохондрий. Кроме того, впервые показана зависимость эффекта ГДК на митохондриях печени от возраста животных. Установлено, что эффективность действия ГДК как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой агрегации и пермеабилзации митохондрий печени увеличивается с возрастом животных, что, по мнению автора работы, обусловлено развитием окислительного стресса, который, как известно, является триггером пермеабилзации мембран митохондрий.

Несомненным достоинством представленной работы является демонстрация эффектов жирных кислот на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую проницаемость искусственной мембраны липосом. Показано, что ГПК и ГДК в комплексе с  $\text{Ca}^{2+}$  способны индуцировать агрегацию и пермеабилзацию липосом, которая сопровождается выходом флуоресцентного красителя сульфородамина Б из везикул. Анализ и сопоставление результатов, полученных на мембранах эритроцитов и митохондрий, а также липосомах, позволили автору выдвинуть гипотезу о наличии универсального механизма, лежащего в основе  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых эффектов продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты, который заключается в агрегации липидных мембран, их перестройкой (полиморфные фазовые переходы) и пермеабилзацией.

Представленная работа имеет, прежде всего, значение для фундаментальных исследований регуляции проницаемости биологических мембран, которая, в частности, играет ключевую роль в индукции гибели клеток.

**Оценка содержания диссертационной работы, ее завершенность**

Диссертационная работа оформлена в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, включая список литературы, проиллюстрирована 22 рисунками, 5 таблицами и содержит 212 ссылок на литературные источники.

Во **введении** автор аргументированно обосновывает выбор темы диссертационного исследования, ее актуальность, практическую значимость и научную новизну. Кроме того, в этом разделе грамотно формулируются цель научного исследования, задачи, поставленные для ее достижения, новизна и научно-практическая значимость полученных в работе результатов, а также положения, выносимые на защиту.

В главе **«Обзор литературы»** изложены данные, необходимые для понимания современного состояния проблемы. Автором подробно рассмотрены липиды мембран, их фазовые переходы. Приведены современные сведения о структуре и функционировании митохондриальной неспецифической поры. Освещены механизмы образования  $\omega$ -производных жирных кислот и их роль в клетках. В целом, литературный обзор полностью соответствует теме диссертационной работы.

Глава **«Материалы и методы исследования»** содержит исчерпывающее описание использованных экспериментальных подходов. Характер изложения предполагает возможность воспроизведения методов при постановке аналогичных экспериментов.

Глава **«Результаты и их обсуждение»** полностью отражает логику исследования и состоит из 4 разделов, которые хорошо иллюстрированы и дополнены таблицами. В экспериментальной части отражена большая работа, проделанная диссертантом и представляющая несомненный интерес.

В **заключении** автор в развернутой форме обобщает и резюмирует основные итоги проведенного научного исследования. Также раскрывается возможное применение полученных результатов при проведении дальнейших фундаментальных и прикладных исследований, связанных с выяснением путей регуляции проницаемости биологических и искусственных мембран.

Материалы диссертации отличает последовательность изложения, аргументированность. Сформулированные автором выводы, в целом, соответствуют поставленным задачам и результатам проведенных исследований, что определяет завершенность представленной диссертационной работы.

**Соответствие паспорту научной специальности**

Диссертационная работа 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» соответствует паспорту специальности 1.5.2 – биофизика, в частности, пункту 2 – Биофизика клетки: биофизика мембран; биоэнергетика (биологические науки). Это подтверждается тем, что в работе выяснены механизмы кальций-зависимого воздействия продуктов  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты –  $\omega$ -гидроксипальмитиновой и  $\omega$ -гексадекандикарбоновой кислот, на биологические и искусственные мембраны. Показано существование универсального механизма, лежащего в основе Ca<sup>2+</sup>-зависимой неспецифической пермеабиллизации липидных мембран клеток, органелл (митохондрий), а также искусственных мембран липосом продуктами  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты, который заключается в агрегации мембран и перестройке липидов. Установлены факторы регуляции этого процесса, а также обосновано его участие в индукции клеточной гибели.

Кроме того, в работе использованы как классические, так и современные методы биофизики: спектрофотометрия, флуориметрия, электронная и конфокальная микроскопия, метод динамического рассеяния света, кондуктометрия.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной форме и соответствует установленным требованиям, материал автореферата достоверно и точно отражает существо и результаты проведенных исследований, их соответствие основным положениям работы. Автореферат, в целом, дает полное представление о содержании разделов диссертации и степени участия автора в исследованиях.

#### **Подтверждение опубликования полученных результатов в печати**

По итогам работы диссертанта опубликовано 4 работы в реферируемых журналах из Перечня ВАК РФ, баз данных «Web of Science» и «Scopus». Кроме того, опубликовано 7 тезисов докладов всероссийских и международных конференций и съездов.

#### **Рекомендации по использованию научных выводов диссертационной работы**

Результаты проведенной диссертантом работы могут быть использованы в научных подразделениях, занимающихся биофизикой мембран, биоэнергетикой митохондрий, а также клеточной патофизиологией, поскольку в настоящее время показано, что жирные

кислоты различной структуры вовлечены в индукцию ряда патофизиологических процессов: апоптоза, ишемии, диабета и других.

### **Замечания к диссертационной работе**

Существенных недостатков в диссертации не выявлено. Однако к работе есть несколько небольших замечаний.

- Описывая современное состояние проблемы, автор в основном уделяет внимание источникам последних лет, забывая о классических работах, положивших основу понимания механизмов образования митохондриальной поры и ее структуры.

- Известно, что свойства жирных кислот, в том числе пермебилизирующие, зависят от длины ацильной цепи. Это было показано и в лаборатории Г.Д. Мироновой в ИТЭБ РАН, так и, в случае дикарбоновых кислот, научным руководителем автора диссертации. Возникает резонный вопрос о зависимости эффектов  $\omega$ -гидроксикарбоновых кислот от длины цепи. К сожалению автор не обсуждает эти данные.

- На рис. 8 автор приводит данные визуализации митохондрий с помощью конфокальной микроскопии с флуоресцентным зондом MitoTracker Red, однако агрегация митохондрий в суспензии может быть эффективнее зарегистрирована с помощью оптической микроскопии или динамического светорассеяния.

- Исследования на липосомах, представляющих собой однослойную мембрану, убедительно доказывают механизм действия изучаемых жирных кислот. Результаты, полученные на эритроцитах, также согласуются с этими данными. Однако в качестве важного замечания хотелось бы отметить, что картину, как это реализуется в случае с двухслойной митохондриальной мембраной, и как этот механизм будет отличаться от липидной поры, индуцированной пальмитиновой кислотой и ионами кальция автор четко не обрисовал.

Стоит отметить, что указанные недостатки работы не носят критического характера и не снижают ценности и значения выполненного исследования.

### **Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Таким образом, диссертация Степановой Анастасии Евгеньевны « $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая агрегация и пермебилизация биологических и искусственных мембран продуктами  $\omega$ -окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки» на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-

квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решены задачи, связанные с выяснением влияния продуктов  $\omega$ -окисления жирных кислот на поведение и свойства биологических и искусственных липидных мембран, что соответствует 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), а ее автор Степанова Анастасия Евгеньевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Отзыв подготовлен доктором биологических наук, профессором РАН Плотниковым Егором Юрьевичем и обсужден на семинаре лаборатории структуры и функции митохондрий Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова. Итоги голосования: «за» - единогласно (протокол №1 от 28 апреля 2022 года).

Зав. лабораторией  
структуры и функции митохондрий,  
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ,  
доктор биологических наук, профессор РАН

Плотников Егор Юрьевич

Зам. директора НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

к.б.н



Фенюк Борис Александрович

119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова - обособленное структурное подразделение; тел. (8495) 9395359; [fxb@genebee.msu.su](mailto:fxb@genebee.msu.su)