

ОТЗЫВ

**официального оппонента кандидата биологических наук
Бережнова Алексея Валерьевича на диссертацию
Степановой Анастасии Евгеньевны на тему
«Ca²⁺-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и
искусственных мембран продуктами ω-окисления жирных кислот:
механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.2 – биофизика**

Актуальность темы исследования. Жирные кислоты (ЖК), являясь компонентами фосфолипидов мембран, в свободной форме играют важную роль в регуляции их проницаемости. Их действие может быть реализовано через достаточно специфичные механизмы. В частности, хорошо известен протонфорный эффект ЖК. С другой стороны, описан феномен неспецифической проницаемости мембран этих органелл, реализуемый при участии длинноцепочечных свободных жирных кислот и ионов двухвалентных металлов, среди которых физиологической значимостью обладают ионы кальция. Большой вклад в это направление сделан школой д.б.н., проф., заслуженного деятеля науки Российской Федерации Галины Дмитриевны Мироновой, долгое время изучающей этот феномен в ИТЭБ РАН. Показано, что такое действие жирных кислот реализуется в мембранах клеток, а также на искусственных липидных мембранах. Постулирована физиологическая и патологическая значимость этого феномена.

Диссертационная работа Степановой Анастасии Евгеньевны дополняет некоторые пробелы в этом обширном направлении исследований и демонстрирует влияние столь необычных аналогов жирных кислот, как ω-гидроксикарбоновые и α,ω-дикарбоновые жирные кислоты, на кальций-зависимую проницаемость биологических и искусственных мембран. Данные о влиянии жирных кислот подобной структуры на мембраны носят

фрагментарный характер, что удивительно, учитывая известную способность продуктов ω -окисления накапливаться в тканях и клетках в значительных количествах при ряде патологий. В этой связи исследование, выполненное Степановой А.Е. является актуальным и соответствующим тенденциям мировой науки.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключения. Степень достоверности полученных диссертантом научных результатов подтверждена данными многих экспериментов, их методически оправданной постановкой и воспроизводимостью.

В работе использовались соответствующие поставленным целям и задачам общепринятые экспериментальные биофизические методы, а также адекватные методы статистической обработки полученных данных. Результаты исследования достаточно полно отражены в иллюстративном материале, позволяющем свободно ориентироваться в представленных экспериментальных данных. Обсуждение результатов исследовательской работы проведено с использованием существенного объема библиографических данных. В целом, научные положения диссертации обоснованы и вытекают из собственных данных автора, выводы и рекомендации, сформулированные на их основе, соответствуют представленным материалам.

Основные положения диссертационной работы и результаты опубликованы в печатных изданиях и прошли апробацию как на всероссийских, так и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, которые входят в перечень ВАК, Web of Science и Scopus.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации. Диссертационная работа изложена на 107 страницах машинописного текста, включает 22 рисунка и 5 таблиц и оформлена в соответствии с предъявляемыми требованиями. Работа построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 212 работ, из них 19

на русском, 193 – на английском языке. Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы», изложенной в 3 подразделах, автор дает адекватный анализ современного состояния изучаемых в работе вопросов влияния жирных кислот на проницаемость липидных мембран. Отдельное внимание уделено механизмам неспецифической проницаемости мембран митохондрий, в частности «классической» поры mPTP. Также подробно описано формирование кальций-зависимой неспецифической поры при участии свободных жирных кислот. В заключении этой части автор приводит данные о влиянии продуктов ω -окисления жирных кислот на биологические объекты.

Экспериментальная часть работы начинается с описания объекта исследования и методов, использованных в диссертации. Для достижения поставленных задач автором применялся широкий круг традиционных и современных биофизических подходов. В целом характер изложения этой главы предполагает возможность воспроизведения методов при постановке аналогичных экспериментов.

«Результаты исследований и их обсуждение» изложены довольно последовательно и отражают решаемые автором задачи, раскрывая суть выполненного диссертационного исследования. Результаты работы можно условно разделить на три больших блока. В первом блоке приведены данные, характеризующие влияние продуктов ω -окисления пальмитиновой кислоты (ω -гидроксипальмитиновой (ГПК) и α,ω -гексадекандиоловой (ГДК) кислот на состояние и проницаемость мембран эритроцитов. Во втором, наиболее обширном блоке, рассмотрены эффекты ГПК и ГДК как модуляторов кальций-зависимой проницаемости мембран митохондрий. В этом случае автор делает упор на митохондрии печени, что выглядит обоснованным. В третьем блоке этого раздела автором исследовано влияние ГПК и ГДК на искусственные мембранные системы, представленные липосомами.

Результаты исследования иллюстрированы данными рисунков и таблиц. Полученные результаты подвергнуты тщательному обсуждению с аргументированной интерпретацией данных современной литературы по рассматриваемой проблеме.

Выводы в диссертационной работе сформулированы четко и соответствуют задачам проведенного исследования.

Научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования. Впервые показано, что ω -гидроксипальмитиновая (ГПК) и α,ω -гексадекандиовая кислоты (ГДК) способны оказывать влияние на мембраны клеток, митохондрий и липосом, и вызывать их агрегацию и пермеабиллизацию. Выявлены условия, необходимые для проявления такого действия ГПК и ГДК. Показано, что нарушение целостности мембран эритроцитов, индуцированное ГПК и ГДК, может способствовать их лизису. В случае митохондрий, такое действие этих ЖК также может приводить к гибели клеток, учитывая выявленный выход проапоптотического белка цитохрома *c* из органелл. Результаты, полученные на лецитиновых липосомах, позволили сделать вывод о наличии общего механизма действия изучаемых жирных кислот на липидные мембраны.

Помимо интересных и оригинальных результатов с чисто фундаментальной точки зрения, тот факт, что продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты способны накапливаться в тканях и клетках в значительных количествах при ряде патологий и то, что все большее количество литературных данных указывают на ключевое участие митохондрий в процессах окислительного стресса, клеточной гибели и механизмах старения, делают данную работу ценной с научно-практической точки зрения.

Соответствие диссертации Паспорту научной специальности.

Диссертационная работа Степановой А.Е. на тему: « Ca^{2+} -зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами ω -окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки» соответствует паспорту специальности 1.5.2 – биофизика.

Результаты научного исследования соответствуют п. 2 – Биофизика клетки: биофизика мембран; биоэнергетика (биологические науки) паспорта специальности.

В целом, рецензируемая работа представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу и не вызывает принципиальных замечаний.

Вопросы и замечания. При общем положительном впечатлении о представленной работе, оценивая диссертацию Степановой А.Е., хотелось бы высказать некоторые замечания и задать ряд вопросов автору.

1. В литературном обзоре, на мой взгляд, не хватает систематических сведений об ионном гомеостазе митохондрий, в частности о механизмах транспорта кальция через МХ мембрану.

2. Недостаточно освещен (помимо обрывочных сведений, представленных на с. 41) вопрос о достижимых концентрациях исследуемых продуктов омега-окисления жирных кислот (ЖК) в норме и при патологиях. Кроме того, отдельного внимания заслуживает вопрос о механизмах транспорта рассматриваемых ЖК из клетки и механизмах их поступления в клетки, особенно при рассмотрении воздействия омега-производных ЖК на типы клеток, в которых они сами не производятся.

3. Стр. 53-54 и Рис. 6. Имеется ли зависимость интенсивности гемолиза от концентрации кальция? Приведены данные с концентрацией кальция 100 мкМ, хотя в сыворотке концентрация кальция на порядок выше? Почему была выбрана такая концентрация CaCl_2 ?

4. Стр. 55 и Табл. 2. Почему выбраны концентрации ЖК порядка десятков мкМ? В сыворотке могут быть сотни микромолей, а при патологиях – вплоть до миллимоля пальмитата (ПК). Кроме того, учитывая разное сродство продуктов омега-окисления ЖК и ПК к альбумину можно было более тщательно отнестись к выбору концентраций ЖК и Ca^{2+} , чтобы смоделировать воздействие ЖК в каких-либо из известных патологий. Также не освещен вопрос о том, каким, например, может быть соотношение концентраций ПК/ГДК. Другими словами, может ли в сыворотке сложиться ситуация, при которой кальций-зависимая пермеабиллизация мембран клеток (например,

эритроцитов) с участием омега-производных будет доминировать над пермеабиллизацией, вызванной ПК?

5. Стр. 58 и Рис. 8. На мой взгляд, использование красителя Mitotracker Red не обосновано. Этот зонд является потенциал-чувствительным и митохондрии (МХ) теряют его при деполяризации. Таким образом деполяризованные МХ будут ускользать от внимания исследователя в представленной постановке эксперимента. А как представлено далее на рисунках 16 и 17, ГПК и ГДК действительно вызывают сброс митохондриального мембранного потенциала (ММП) в присутствии ионов кальция. В этом случае лучше использовать митотрекер зеленый (MitoTracker Green), а сочетанное использование обоих зондов позволило бы автору выявить возможную корреляцию между степенью агрегации МХ и уровнем ММП.

6. Стр. 68 и Рис. 18. Почему FCCP добавлен только в экспериментах, результаты которых проиллюстрированы кривыми, обозначенными цифрой 1? Хотелось бы видеть амплитуду падения аутофлуоресценции NADH в контрольных опытах при действии разобщителя и общий пул NADH под действием цианида.

7. К сожалению, в рукописи и в автореферате отсутствует обобщающая схема, например, в разделе «Заключение». Ведь в работе раскрывался механизм действия производных ЖК на клетки, органоиды и мембраны, в частности обнаружены эффекты пермеабиллизации и агрегации. Иллюстрация, суммирующая полученные данные давала бы наглядное представление о раскрытых явлениях.

Заключение. Диссертация Степановой Анастасии Евгеньевны на тему: «Ca²⁺-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами ω-окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика, посвящена актуальной теме. В ней полностью, на современном научно-методическом уровне, решены поставленные задачи.

Автореферат и опубликованные работы отражают содержание диссертации.

Таким образом, диссертация Степановой А.Е. является законченной научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение одной из приоритетных задач биофизики и науки о мембранах.

Диссертация Степановой Анастасии Евгеньевны соответствует требованиям, изложенным в 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 на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Официальный оппонент

ведущий научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», кандидат биологических наук (03.00.02 – биофизика).

142290, Московская область, г. Пущино,
ул. Институтская, д. 3,
Тел.: +7 (4967)739125
e-mail: g_56@rambler.ru

31.05.2022 г.

Содержит *всех* *и.т.д.* *А.В. Березнов* *Диссертацию;*
Экз. Диссертатора ИБФК РАН *Исслед. Института* *по*
научной работе *и.т.д.* *и.т.д.* *научные*



Алексей Валерьевич Березнов