

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию А.Г. Рогова «взаимосвязь между окислительным стрессом, дисфункцией митохондрий, их фрагментацией и апоптозом в клетках дрожжей.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.щ4 Биохимия.

Процессы, происходящие в митохондриях при окислительном стрессе, в последнее время стали интенсивно изучаться. Связано это с тем, что наблюдаемое при стрессе избыточное повышение внутриклеточной генерации в митохондриях активных форм кислорода (АФК), приводит к развитию тяжёлых патологий, таких как инфаркты, инсульты, хроническое воспаление и др, которые лидируют в списке причин смертей. В связи с этим диссертационную работу А.Г. Рогова, посвященную изучению взаимосвязи между окислительным стрессом и дисфункцией митохондрий без сомнения, можно отнести к числу актуальных фундаментальных исследований современной биологии и медицины.

Диссертация изложена на 159 страницах по традиционной схеме и содержит разделы: Введение, Обзор литературы (3 главы), Методы и материалы, Результаты (8 глав), Заключение, Выводы и Список литературы (259 ссылок). В составе работы 4 таблиц и 89 рисунков, что говорит о большом демонстрационном материале диссертации

Диссертация построена очень логично, написана простым и ясным языком и хорошо проиллюстрирована.

Во «Введении» описаны и аргументированы актуальность, научная новизна, практическая значимость работы, сформулированы цель и задачи исследования, представлены необходимые сведения по апробации работы, ее связи с крупными исследовательскими программами, о структуре и объеме работы.

Обзор литературы содержит подробное изложение современных представлений о связи митохондрий с окислительным стрессом, причём не только у дрожжей, но и у животных. В обзоре описываются также данные об апоптозе у дрожжей и об альтернативной оксидазе дрожжей..

Все описываемые темы содержат как исторические справки, так и новейшие сведения, представленные ссылками последних лет. Автор критически подходит к

изложению материала, обращая особое внимание на достоверность опубликованных материалов.

В разделе «Методы и материалы» описаны все использованные в экспериментальной работе методы и приемы. Их 14 и это необычно много для кандидатской диссертации. В этом разделе автор разумно сочетает краткое описание рутинных методов с ссылками к соответствующим публикациям.

Раздел «Результаты и обсуждение» информативен, хорошо проиллюстрирован рисунками и таблицами. Однако, я сторонник разделять эти два раздела, так как в разделе «Обсуждение результатов» диссертанты обычно сводят результаты проведенных исследований в общую картину с обсуждением своих и анализа литературных данных сходного направления, а также показа, что нового в данном вопросе они сделали. Одной с небольшим страницы «Заключения» представленного автором в данной работе, по моему мнению недостаточно».

В первом разделе «Результатов и обсуждений» диссидентом приведены данные большого количества исследований по действию четырех известных прооксидантов на различные биоэнергетические параметры митохондрий печени крыс. Все эти вещества создают окислительный стресс в митохондриях, однако, как показано в работе их влияние на митохондрии различно. Хотелось бы услышать мнение автора, влияние какого из этих факторов на митохондрии ближе к тому, что наблюдается в митохондриях печени животных при создании у них *in vivo* состояния гипоксии. Кроме того, автор использует повышенные концентрации субстратов (20 мМ против 3-5 мМ используемых обычно работе с митохондриями животных). Ведь известно, что К_m для сукцината равно 0.3 мМ, а его концентрация в тканях не превышает 1 мМ. Вероятно, сказался опыт работы диссидентата с митохондриями дрожжей, которые менее энергизованы и требуют для своей работы большие концентрации субстрата.

Следующий большой раздел работы касается исследования на созданных моделях веществ, которые могут предотвратить или снизить последствия окислительного стресса. Использовались известные протонофоры, и так называемые так называемые ионы Скулачёва. Кстати, когда говорится о механизме действия протонофоров на снижение образования перекисей, нужно было сослаться на оригинальную работу Коршунова а Биохимии, где впервые показан механизм этого действия.

Диссидентом показано, что катионные протонофорные разобщители, накапливающиеся в митохондриях в соответствии с величиной мембранныго потенциала в больших количествах, существенно увеличивали скорость окисления субстратов в состоянии 4, что указывало на их разобщающее действие. Что касается одного из них, а именно бензалкония хлорида, то в работе было обнаружено, что он, помимо разобщения, ингибитирует также, дыхательную цепь, активирует открытие МРТ поры, ингибитирует синтез АТФ и увеличивает продукцию АФК. Эти данные, по мнению диссидентанта, указывает на небезопасность использования бензалкония хлорида в виде глазных капель.

Другой известный разобщитель - C₄R1, снижает мембранный потенциал, причём при окислении NAD-зависимых субстратах в гораздо большей степени, чем при окислении сукцината, а также усиливает эффект пальмитата. Следует отметить, что по литературным данным эндогенного пальмитата в митохондриях не более 15 мкМ, а при этих концентрациях он, по данным диссидентанта, он разобщает слабо. Этот катион ингибитирует также комплекс I дыхательной цепи, активирует открытие МРТ поры, ингибитирует синтез АТФ, поэтому и его использовать в медицинских целях следует осторожно.

Наиболее перспективным для использования в качестве разобщителя, снижающего образование в митохондриях пероксида в медицинских целях является, по мнению автора, разобщитель нового поколения SkT1. Он, являясь разобщителем, обладает минимумом побочных эффектов на энергетику митохондрий. Автором установлено, что он снижает уровень АФК в клетках дрожжей и предотвращает гибель клеток. По этой части работы у меня возник вопрос, как быстро этот катион выводится из организма, что очень важно для его использования в медицинских целях.

Следующим интересным, с моей точки зрения, разделом работы несколько отличающимся от первой части работы является построение диссидентом трёхмерной модели альтернативной оксидазы дрожжей. Эта часть работы выполнена на хорошем молекулярном уровне. Показано, что структура активного центра довольно консервативна и RMSD составляет менее 2А., найдены номера и положения остатков активного центра, представлены сайты связывания железа, убихинола и адениновых нуклеотидов. Проведена правильность модели и улучшение её качества. По этой части у меня замечаний нет, кроме того, что её, вероятно, лучше было поставить в конце работы.

Последняя часть работы касается поиска автором апоптотических генов в геноме дрожжей, действия окислительного стресса на клетки дрожжей и изучение роли фрагментации митохондрий в индукции клеточной смерти дрожжей. Показано, что катионы, синтезированные в лаборатории Скулачёва вдвое и даже полностью, в зависимости от постановки эксперимента, увеличивают выживаемость клеток дрожжей *Y. lipolytica* в условиях окислительного стресса.

В этой части работы автором получены интересные данные о влиянии ингибитора деления клеток на фрагментацию митохондрий, из которых он делает заключение, что фрагментация митохондрий может рассматриваться как один из механизмов защиты клеток от окислительного стресса. Это очень важный вывод, но я бы посоветовала ему в дальнейшей работе при создании гипоксии использовать электронную микроскопию клеток, так как там происходит, вероятно, не фрагментация, а деление клеток. Судя по нашим неопубликованным данным, не длительная гипоксия, при которой развиваются процессы адаптации, действительно приводит к усилению деления митохондрий.

. В заключении хочу сказать, что Выводы работы соответствуют поставленным цели и задачам и в полной мере отражают характер проделанной автором работы.

Материалы диссертации были представлены на отечественных и международных конференциях, по результатам диссертации опубликовано 9 работ, 4 из которых напечатана за рубежом. Результаты работы, изложенные в автореферате диссертации, соответствуют материалам диссертации.

По актуальности и полученным результатам диссертационная работа А.Г.Рогова несомненно соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а её автор безусловно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук.

Заведующий лабораторией митохондриального транспорта
Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

заслуженный деятель наук РФ,
доктор биол. наук, профессор
(03.01.04 - Биохимия)

30 мая 2016

