



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

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

02.12.2020 № 1349-20/013-03
На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

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



Федянин Андрей Анатольевич

_____ 2020 года

ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу Екатерины Сергеевны Харечкиной «Регуляция неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации супероксид-аниона пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля», предоставленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Диссертационная работа Е.С. Харечкиной посвящена исследованию роли пиридиновых нуклеотидов цитозоля в регуляции неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации митохондриями супероксид-аниона.

Актуальность избранной темы

Неспецифическая Ca^{2+} -зависимая митохондриальная пора (РТР) с разной интенсивностью изучается уже около 60 лет. За это время были установлены основные механизмы ее регуляции; выявлено несколько митохондриальных белков, участвующие в данной регуляции. Кроме того, была показана критическая роль индукции РТР в развитии многих патологических процессов, включая ишемическую болезнь сердца и мозга, нейродегенеративные и дистрофические изменения в органах и тканях. В то же время, молекулярная структура РТР все еще остается предметом дискуссии, а лекарственные препараты, действие которых направлено на известные регуляторные белки РТР,

демонстрируют лишь ограниченную эффективность в клинике. Поэтому, исследование новых механизмов регуляции РТР продолжает оставаться актуальной биохимической и биомедицинской задачей.

Хорошо известно, что адениновые и пиридиновые нуклеотиды являются мощными эндогенными регуляторами состояния РТР. Многочисленными исследованиями было убедительно показано, что адениновые (АТФ и АДФ) и пиридиновые нуклеотиды (НАДН и НАДФН), действуя со стороны матрикса, подавляют открывание РТР и повышают устойчивость митохондрий к кальциевым нагрузкам. Было предложено несколько механизмов, объясняющих эффект нуклеотидов матрикса в отношении РТР в митохондриях. В то же время, возможность регуляции РТР нуклеотидами со стороны цитозоля практически не исследована. Работа Екатерины Сергеевны Харечкиной посвящена именно этому малоизученному вопросу.

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

Научные положения, сформулированные автором диссертационного исследования, полностью обоснованы, достоверны и логически вытекают из результатов проведенного исследования и полностью их отражают. Выводы, которые делает автор на основании совокупности данных, представленных в работе, полностью обоснованы.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

Научная новизна работы не вызывает сомнения. Фактически, в работе Екатерины Сергеевны исследовано два аспекта проблемы. Во-первых, изучен эффект различных пиридиновых нуклеотидов, не проникающих в матрикс интактных митохондрий, на индукцию РТР кальцием; исследована роль нуклеотид-связывающих белков внешних отделов митохондрий (а именно, транслоказы адениновых нуклеотидов (АНТ), короткий Ca^{2+} -связывающий переносчик адениновых нуклеотидов SCaMC, потенциал-зависимого анионного канала VDAC) в данном эффекте. Во-вторых, изучена роль цитозольных пиридиновых нуклеотидов в генерации супероксидных вспышек в изолированных митохондриях, внутренняя мембрана которых пермеабелизована в результате открывания РТР или действия порообразующих пептидов.

Автор впервые показал, что НАДН и, в меньшей степени, НАД в физиологических концентрациях (50 – 1000 мкМ) дозозависимо подавляют открывание РТР в терминально дифференцированных клетках. Эффект реализуется через аллостерический нуклеотид-связывающий сайт, локализованный во внешней мембране или межмембранном пространстве митохондрий. Ранее, единственная работа, исследующая прямой эффект добавленного НАДН на РТР [Hunter, Haworth, 1979], показала, что в деэнергизованных митохондриях, нуклеотид не оказывает ингибирующего действия в среде инкубации.

Возможно, причиной неэффективности НАДН являлся состав используемой среды инкубации митохондрий – в ней отсутствовали фосфат и магний. В настоящей работе автором была использована среда инкубации, более близкая к физиологическим условиям – стандартная KCl-среда, содержащая субстраты дыхания, 2 мМ $MgCl_2$ и 2 мМ KH_2PO_4 . Обнаружено, что ионы магния дозозависимо увеличивают эффект НАД(Н). Показано, что белки SCaMC и VDAC не являются НАД(Н)-связывающими регуляторами РТР.

Впервые показано, что цитозольный НАД(Н) стимулирует обмен адениновых нуклеотидов между матриксом митохондрий и средой инкубации с участием транслоказы адениновых нуклеотидов. Кроме того, обнаружено, что ингибиторы АНТ снижают защитное действие НАД(Н) в отношении индукции РТР.

Впервые показано, что пермеабиллизация мембран изолированных митохондрий вызывает генерацию всплеск супероксид-аниона, независимо от способа пермеабиллизации (открытие РТР, формирование аламетициновой или фузарицидиновой поры). При этом добавленные НАДФН и НАДН поддерживают и усиливают данные всплески: окисление нуклеотидов до определенных значений редокс-потенциалов (от -315 до -297 мВ и от -325 до -270 мВ, соответственно) сопровождается пиком продукции супероксид-аниона. Показано, что основной вклад в данный процесс делают НАДФН-зависимые ферменты матрикса. Снижение концентрации физиологических дыхательных субстратов способствует появлению всплеск.

Полученные данные раскрывают новые механизмы участия пиридиновых нуклеотидов цитозоля в регуляции клеточной гибели при физиологических и патологических состояниях. Показано, что, с одной стороны, НАД(Н) ингибирует открытие РТР и, таким образом, может участвовать в подавлении клеточной гибели по внутреннему (митохондриальному) пути апоптоза. Данный механизм может лежать в основе потери жизнеспособности клетки при повышенной активации НАД-потребляющих ферментов (поли(АДФ-рибоза)-полимераз, синтаз циклической АДФ-рибозы (CD38 и CD157), SARM1) и снижения уровня НАД(Н) в клетке. С другой стороны, при патологических процессах, сопровождающихся повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле и открытием РТР, падение уровня дыхательных субстратов и НАД(Ф)Н ниже физиологических значений может стимулировать продукцию всплеск супероксид-аниона. При этом активные формы кислорода, окисляя тиоловые группы регуляторных белков (глутатион, тиоредоксин, Nrf2-Keap-1 и др.) и липиды, могут вызывать изменения проницаемости клеточных мембран и нарушение структуры цитоскелета, а также модулировать транскрипцию белков-антиоксидантов и ферментов, участвующих в апоптозе, некрозе и пролиферации клеток (NF- κ B, p53, HIF-1 α , Nrf2, MAPK и др.). Кроме того, АФК участвуют в распространении «волны дисфункции» в сети митохондрий при открытии

РТР. Таким образом, описанные в настоящей работе данные дают представление о новых механизмах участия пиридиновых нуклеотидов цитозоля в регуляции жизнеспособности клеток и служат основой для поиска мишеней фармакологического воздействия при терапии заболеваний, в основе которых лежит запуск клеточной гибели в результате изменения уровня пиридиновых нуклеотидов в клетке и открывания РТР.

Оценка содержания диссертационной работы, ее завершенность

Работа Е. С. Харечкиной построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения и обсуждения полученных результатов, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 123 страницах машинописного текста, включая список литературы, содержит 27 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 321 источник отечественной и зарубежной литературы.

Во **введении** автор аргументированно обосновывает выбор темы диссертационной работы, ее актуальность, научную новизну и научно-практическую значимость. В данном разделе грамотно сформулированы цель научного исследования, задачи и положения, выносимые на защиту.

В главе **«Обзор литературы»** подробно описаны современные представления о структуре и механизмах регуляции РТР, описаны механизмы образования АФК при пермеабиллизации мембран митохондрий (321 отечественных и зарубежных источников). Также в данном разделе обоснована необходимость проведения данной работы.

Глава **«Материалы и методы исследования»** написана исчерпывающе подробно, в ней дается описание экспериментальных процедур и методов обработки и анализа данных. Представленная информация позволяет сделать заключение о достоверности полученных результатов.

В главе **«Результаты и обсуждение»** описаны и проанализированы основные результаты исследования, которые проиллюстрированы 24 рисунками и 1 таблицей. Обсуждение результатов показывает, что автор четко понимает биологический и физиологический смысл описанных в диссертации новых фактов, и понимает необходимость дальнейших исследований в этой области.

В разделе **«Заключение»** представлены выводы диссертационной работы. Выводы основаны на полученных в работе данных и соответствуют поставленным задачам. Сделанные выводы подтверждают то, что рассматриваемую диссертационную работу следует считать законченным научным исследованием.

Представленные в диссертации результаты экспериментов, несомненно, свидетельствуют, что поставленные автором задачи были успешно решены.

Тема диссертации, ее положения и выводы полностью соответствуют специальности 03.01.04 – биохимия.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной форме, соответствует установленным требованиям и дает представление о содержании разделов диссертации и степени участия автора в исследованиях.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в публикациях автора. Всего по теме диссертационной работы опубликовано 12 научных работ: 4 статьи в реферируемых журналах из Перечня ВАК РФ (3 в международных журналах 1-го и 2-го квартиля и 1 в отечественном журнале), в трех из которых автор является первым автором, 1 монография и 7 публикаций в материалах всероссийских и международных конференций.

Рекомендации по использованию научных выводов диссертационной работы

Результаты исследований имеют существенное значение для биохимии и медицины и могут быть рекомендованы для использования в экспериментальной работе профильных лабораторий, а также для разработки новых подходов к фармакологическому управлению открыванием РТР и цитопротекции в различных патологических условиях.

Замечания к диссертационной работе

В ходе ознакомления с диссертационной работой серьезных недостатков выявлено не было. В то же время, к работе имеется замечание. В частности, соискателю следовало бы сделать обсуждение полученных результатов более всесторонним, поскольку материал имеет более широкое значение, чем регуляция открывания РТР и генерации всплеск супероксид-аниона пиридиновыми нуклеотидами. Автору стоило бы подчеркнуть, что полученные данные свидетельствуют о наличии модулируемого уровнем цитозольных пиридиновых нуклеотидов канала связи между митохондриями и цитозолем клетки, работа которого регулирует жизнеспособность клеток. Несмотря на заверченный характер диссертации, работа в этом направлении требует продолжения уже на клеточном уровне. Однако, указанный недостаток носит рекомендательный характер, не касается существа работы и не снижает ее ценности.

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

Таким образом, диссертация Харечкиной Екатерины Сергеевны «Регуляция неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации супероксид-аниона пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля» на соискание ученой степени кандидата биологических наук законченной научно-квалификационной работой, в которой,

на основании выполненных исследований, решены задачи, связанные с выяснением роли пиридиновых нуклеотидов цитозоля в регуляции неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации митохондриями супероксид-аниона, что соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с изменением Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №365, а автор Харечкина Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв составлен заведующим лабораторией структуры и функции мембран НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, доктором биологических наук, профессором Ягужинским Львом Сергеевичем. Отзыв заслужен и утвержден на семинаре отдела биоэнергетики НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ 18 марта 2020 года (протокол №2).

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



Ягужинский Лев Сергеевич

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

Богданов Алексей Алексеевич



119992, 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