



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

04.04.14 № 40.1/2-214.1-274

на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук, д.х.н.
Ямпольский И.В.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Кареевой Александры Владимировны по теме «Генерация перекиси водорода митохондриями: роль дигидролипоилдегидрогеназы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Диссертационная работа А.В. Кареевой посвящена изучению механизмов генерации пероксида водорода митохондриями, в частности посредством фермента дигидролипоилдегидрогеназы. Область биологии, к которой относится данная диссертационная работа теснейшим образом связана с медициной, так как окислительный стресс и нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках и тканях лежат в основе патогенеза большого количества заболеваний. Кроме того, окислительная теория старения также предполагает прямое участия кислородных свободных радикалов в инициации ошибок генома, повреждений белков и общего дисбаланса в организме. Таким образом, работа представляет собой актуальное исследование, важное для

биомедицинских наук.

Несмотря на прогресс в данной области, достигнутый за несколько последних десятилетий, множество вопросов остаются unanswered. Какие ферментативные системы вносят основной вклад в продукцию активных форм кислорода (АФК) митохондриями? Все ли подобные системы нам известны и охарактеризованы? Вносят ли отдельные системы наибольший вклад в продукцию АФК или несколько систем активны одновременно? Отличаются ли параметры генерации АФК митохондриями *in vitro* от таковых *in situ*, и если да, то в какой степени? Рассматриваемая диссертационная работа призвана ответить на часть этих вопросов и приблизить нас к пониманию роли митохондрий в редокс-балансе живых систем.

В основе работы лежат ранее полученные в лаборатории данные о существовании митохондриального источника АФК, продукция пероксида водорода которым стимулируется ионами аммония. Считается практически устоявшейся догмой, что основным источником АФК в митохондриях является Комплекс I дыхательной цепи. Но, по-видимому, в физиологических условиях продукция пероксида водорода не сильно выражена. Перед автором стояла задача идентификации источника аммоний-стимулируемой продукции АФК и характеристики его активности.

В результате работы было установлено, что стимулируемая ионами аммония NADH-зависимая генерация пероксида водорода в митохондриях катализируется дигидролипоилдегидрогеназой (ДЛДГ). При этом вклад ДЛДГ в митохондриальную продукцию пероксида водорода был довольно высок: половина продукции пероксида опосредована Комплексом I, а другая – ДЛДГ. В присутствии аммония вклад ДЛДГ в суммарную продукцию АФК митохондриями возрастает до 90%. Таким образом, в работе установлен новый источник АФК, как минимум не уступающий по значимости ранее известным митохондриальным системам, а в определенных превосходящий их по уровню продукции H_2O_2 .

Другим чрезвычайно интересным результатом работы стали данные о проницаемости мембран для пероксида водорода. Долгое время в редокс-биологии доминировало представление о том, что пероксид водорода, как амфифильная молекула, способен свободно проникать через мембраны. Однако в последнее время в клеточной биологии стали появляться данные о том, что перемещение H_2O_2 через биологические мембраны опосредовано аквапоринами, каналами для транспорта воды, а также, возможно, другими ионными каналами. Так, блокировка аквапоринов полностью ингибирует перемещение H_2O_2 через мембрану клеток HeLa вплоть до концентрации 500 мкМ. Однако оставалось неясно, распространяется ли это наблюдение на внутреннюю

мембрану митохондрий. Авторами был разработан и реализован интересный экспериментальный подход, основанный на стимуляции продукции АФК митохондриями с частично пермеабелизованными мембранами. Пермеабелизация митохондрий аламетицином увеличивает скорость образования АФК и стимулирует образование кислорода из добавленного извне пероксида водорода каталазой матрикса. Это свидетельствует о том, что митохондриальная внутренняя мембрана действительно представляет собой барьер для диффузии пероксида водорода. Работа подводит нас к целому ряду вопросов. Регулируется ли проницаемость внутренней мембраны митохондрий для пероксида водорода? Если да, то каким образом и каковы молекулярные основы этого процесса? Важно ли это для транспорта H_2O_2 из матрикса в цитоплазму или наоборот, из цитоплазмы в матрикс? Являются ли нарушения барьерной функции митохондриальной мембраны причиной окислительного стресса? Полученные в работе новые данные открывают, таким образом, целое направление дальнейших исследований в биохимии и клеточной биологии.

Наконец, в работе были поставлены вопросы о сопоставимости данных по генерации АФК митохондриями, получаемых в экспериментах *in vitro*, с таковыми в физиологических условиях. Авторы максимально привели условия *in vitro* к физиологическим условиям по концентрации кислорода и соотношению $NAD^+/NADH$ и продемонстрировали, что в этих условиях генерация АФК достигает 20% от максимальных значений. Много это или мало? Представляется, что такие цифры вполне способны обуславливать значимые уровни генерации АФК на уровне клетки, а значит, митохондрии действительно могут вносить вклад как в тиол-опосредованную регуляцию функций белков, так и в развитие окислительного стресса.

Таким образом, все результаты и выводы диссертационной работы отличаются новизной, носят характер завершеного исследования, и вместе с тем формируют задел для дальнейших исследований в области окислительно-восстановительных процессов в митохондриях.

Диссертационная работа представляет несомненную практическую ценность. Избыточная генерация активных форм кислорода лежит в основе патогенеза многих заболеваний, в числе которых разнообразные ишемические, воспалительные заболевания, нейродегенерации. Понимание природы окислительного стресса, источников и путей распространения АФК в клетке, поиску которых и посвящена данная работа, позволит создавать новые лекарственные препараты направленного действия.

Диссертация Кареевой Александры Владимировны построена по традиционной

схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, описания результатов, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация содержит 129 страниц и 289 ссылок на цитируемые работы.

Из введения хорошо понятна актуальность и задачи работы. Литературный обзор написан хорошим языком и удачно структурирован. В первой части литературного обзора последовательно перечислены основные представители активных форм кислорода, отмечены их особенности. Вторая часть обзора литературы посвящена митохондриальным источникам АФК. Также в обзоре рассмотрены основные антиоксидантные системы клетки.

В обзоре литературы автор ссылается как на классические статьи по выбранной тематике, так и на новейшие научные исследования. В целом обзор дает четкое представление о современном состоянии данной области исследований и позволяет судить о значении результатов, полученных в диссертационной работе.

В диссертации были использованы современные подходы в решении поставленных задач. В главе «Материалы и методы» приводится подробная характеристика используемых реактивов, а также использованных в работе методов фракционирования клеток, получения митохондрий и выделения ферментных комплексов, аналитические методы и способы статистической обработки данных. В результате, ход выполнения экспериментов, описанных в работе, хорошо понятен, а высокий профессиональный уровень работы не вызывает сомнений.

Автореферат полностью отражает результаты данной диссертационной работы и хорошо написан. Основные результаты диссертации были опубликованы в российских и зарубежных рецензируемых журналах, а также представлены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация Кареевой А.В. является важным научным исследованием и вносит существенный вклад в изучение генерации и распространения активных форм кислорода в живых системах. Полученные результаты будут востребованы в широком круге отечественных и зарубежных научных организаций, в т.ч. в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Институте биоорганической химии РАН, Институте молекулярной биологии РАН, Институте биологии гена РАН, НИЦ «Биотехнологии» и других научных центрах.

К замечаниям по работе можно отнести некоторое количество неточностей. Так, в разделе «Обзор литературы» NADPH-оксидаза 4 указана в качестве одного из источников

пероксида водорода в митохондриях, и даже приводится ссылка на соответствующее исследование. Однако митохондриальная локализация Nox4 является крайне противоречивой, качество иллюстративного материала в цитируемой статье довольно низко и позволяет сделать вывод лишь о возможной колокализации фермента с митохондриальными маркерами. Кроме того, многими исследователями продемонстрирована ретикулярная локализация этого фермента. Наконец, NADPH-оксидазы являются электрогенными ферментами, перенося электрон через мембрану. При рассмотрении Nox в качестве митохондриальных генераторов АФК надо представлять ее топологию в мембране и направление переноса электрона. Таким образом, не совсем корректно упоминать NADPH-оксидазы в одном ряду с классическими митохондриальными источниками АФК. На странице 45 автор описывает глутатион в качестве восстанавливающего агента для окисленных тиолов в клетке. Было бы корректно упомянуть, что реакции тиолового обмена в клетке в основном катализируются глутаредоксинами.

Однако более серьезных замечаний, чем приведенные выше, к работе нет. Имеющиеся замечания не снижают хорошего впечатления от работы и носят характер пожеланий.

В целом, диссертация Кареевой А.В. представляет собой законченное научное исследование. Работа выполнена на самом современном научно-методическом уровне, достаточно аккуратно и грамотно оформлена, удачно иллюстрирована, легко читается и производит хорошее впечатление. Не вызывает сомнений обоснованность научных выводов, сформулированных в диссертации. Все результаты работы получены автором впервые. По актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений, достоверности полученных данных и выводов, объёму, новизне, теоретической и практической значимости исследований, представленная диссертация соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного правительством РФ, от 24 сентября 2013 г № 842 (с изменениями Постановления правительства РФ от 21.04.2016 №748), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Кареева Александра Владимировна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании лаборатории молекулярных технологий
ИБХ РАН 14 марта 2017 года.

Заведующий Лабораторией молекулярных технологий
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, д.б.н., Профессор РАН,
Белоусов Всеволод Вадимович
e-mail: belousov@ibch.ru



Подпись Белоусова В.В. удостоверяю.

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, доктор физико-математических наук,
Олейников Владимир Александрович
e-mail: voleinik@mail.ru



Сведения

о ведущей организации по диссертации Кареевой Александры Владимировны по теме «Генерация перекиси водорода митохондриями: роль дигидролипиддегидрогеназы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Полное и сокращенное наименование ведущей организации	Почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты, адрес официального сайта в сети Интернет	Список основных публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)	Адрес: ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997. телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru Сайт: www.ibch.ru	1: Bilan DS, Belousov VV. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. Free Radic Biol Med. 2016 Dec 6. pii: S0891-849(16)31092-9. 2: Bilan DS, Belousov VV. Genetically encoded probes for NAD(+)/NADH monitoring. Free Radic Biol Med. 2016 Nov;100:32-42. 3: Gibhardt CS, Zimmermann KM, Zhang X, Belousov VV, Bogen I. Imaging calcium and redox signals using genetically encoded fluorescent indicators. Cell Calcium. 2016 Aug;60(2):55-64. 4: Bilan DS, Belousov VV. HyPer Family Probes: State of the Art. Antioxid Redox Signal. 2016 May 1;24(13):731-51. 5: Erpanneedi R, Belousov VV, Schäfers M, Kiefer F. A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level. EMBO J. 2016 Jan 4;35(1):102-13. 6: Matlashov ME, Bogdanova YA, Ermakova GV, Mishina NM, Ermakova YG, Nikitin ES, Balaban PM, Okabe S, Lukyanov S, Enikolopov G, Zaraisky AG, Belousov VV. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. Biochim Biophys Acta. 2015

		Nov;1850(11):2318-28. 7: Mishina NM, Mishin AS, Belyaev Y, Bogdanova EA, Lukyanov S, Schultz C, Belousov VV. Live-Cell STED Microscopy with Genetically Encoded Biosenscr. Nano Lett. 2015 May 13;15(5):2928-32. 8: Schwarzländer M, Wagner S, Ermakova YG, Belousov VV, Radi R, Beckman JS, Buettner GR, Demarex N, Duchon MR, Forman HJ, Fricker MD, Gems D, Halestrap AP, Halliwell B, Jakob U, Johnston IG, Jones NS, Logan DC, Morgan B, Müller FL, Nicholls DG, Remington SJ, Schumacker PT, Winterbourn CC, Sweetlove LJ, Meyer AJ, Dick TP, Murphy MP. The 'mitoflash' probe cpYFP does not respond to superoxide. Nature. 2014 Oct 23;514(7523):E12-4. 9: Ermakova YG, Bilan DS, Matlashov ME, Mishina NM, Markvicheva KN, Subach OM, Subach FV, Bogeski I, Hoth M, Enikolopov G, Belousov VV. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. Nat Commun. 2014 Oct 21;5:5222. 10: Matlashov ME, Belousov VV, Enikolopov G. How much H₂O₂ is produced by recombinant D-amino acid oxidase in mammalian cells? Antioxid Redox Signal. 2014 Mar 1;20(7):1039-44. 11: Bilan DS, Matlashov ME, Gorokhovatsky AY, Schultz C, Enikolopov G, Belousov VV. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD⁺/NADH ratio changes in different cellular compartments. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1840(3):951-7. 12: Lukyanov KA, Belousov VV. Genetically encoded fluorescent redox sensors. Biochim Biophys Acta. 2014 Feb;1840(2):745-56. 13: Bilan DS, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Gadella TW, Grabher C, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. HyPer-3: a genetically
--	--	--

		encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. ACS Chem Biol. 2013 Mar 15;8(3):535-42. 14: Mishina NM, Markvicheva KN, Fradkov AF, Zagaynova EV, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. Imaging H₂O₂ microdomains in receptor tyrosine kinases signaling. Methods Enzymol. 2013;526:175-87. 15: Mishina NM, Markvicheva KN, Bilan DS, Matlashov ME, Shirmanova MV, Liebl D, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV. Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe. Methods Enzymol. 2013;526:45-59.
--	--	---

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Институт биоорганической химии

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук, доктор физико-математических наук,

Олейников Владимир Александрович

e-mail: voleinik@mail.ru

