

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора биологических наук
Белослудцева Константина Николаевича на диссертационную работу
Хизриевой Саимат Ибрагимовны на тему: «Интенсивность оксидативного стресса и
структурно-функциональное состояние мембран митохондрий печени крыс при
гипотермии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.4. - биохимия

Актуальность темы исследования.

Активность внутриклеточного метаболизма позвоночных животных регулируется широким спектром условий окружающей среды. При этом считается, что в случае гомойотермных животных изменение температуры окружающей среды не несет какого-то принципиального значения. В то же время, гипотермия нашла достаточно широкое применение в современной медицине, поскольку обладает протекторным и «консервирующим» действием вследствие снижения скорости внутриклеточного метаболизма. С другой стороны, гипотермия может индуцировать и нежелательные последствия для живой клетки, что, согласно литературным данным, связано с индукцией как окислительного стресса, так и метаболических нарушений. В связи с этим исследования влияния гипотермии различной длительности и глубины на функционирование организма, тканей, клеток и внутриклеточных органелл является важной и актуальной задачей. Диссертационная работа Хизриевой С.И. как раз посвящена такому исследованию.

Основной задачей в своей работе диссертант видит как исследование функционального состояния митохондрий печени крыс, подверженных воздействию гипотермии различной глубины. Выбор объекта исследования не удивителен, поскольку именно митохондрии являются главным внутриклеточным хабом, объединяющем в себе большинство метаболических путей клетки. Комплексность исследования связана с тем, что автор в своей работе использовал 3 режима гипотермии и для каждого режима описал антиоксидантный статус митохондрий и их функциональную активность. Этот анализ позволил диссертанту выявить новые закономерности и предложить будущее направление в развитии тематики холодовой адаптации организма.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации.

Диссертационная работа Хизриевой С.И. составлена по традиционной схеме. Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 274 источника. Работа изложена на 159 страницах и включает 29 рисунков и 6 таблиц.

Во «Введении» автор описывает важность изучаемой темы, формирует цель и задачи работы, характеризует научную новизну, теоретическую и практическую значимость результатов исследования, определяет научные положения, выносимые на защиту, приводит данные о личном вкладе, публикациях в журналах и апробации работы на конференциях.

В разделе «Обзор литературы» Саимат Ибрагимовна представила свой взгляд на изучаемую проблему. 8 глав данного раздела преимущественно связаны с митохондриями как основным объектом диссертационной работы. Помимо этого, отдельное внимание уделяется развитию окислительного стресса и эффектам гипотермии на физиологические и биохимические параметры гомойотермных животных

В разделе «Материалы и методы исследования» автор приводит описание всех методик, используемых в работе. В качестве ключевых методов в работе используются методы исследования митохондрий и мембран животных клеток, а также биохимии окислительного стресса. Исходя из использованных методов и полученных результатов можно сказать, что диссертация Хизриевой С.И. является классической работой в области митохондриологии.

В работе автор ставит перед собой три основные задачи: 1) определить влияние гипотермии различной глубины и длительности *in vivo* на развитие окислительного стресса в митохондриях печени крыс; 2) охарактеризовать структурно-динамические параметры мембран митохондрий в условиях гипотермии; 3) исследовать функциональную активность митохондрий печени крыс, подверженных *in vivo* гипотермии различной длительности и глубины. Результаты исследования изложены в 9 главах. Первые три главы посвящены анализу интенсивности окислительных процессов, активности антиоксидантных ферментов митохондрий и определению количества низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы в митохондриях печени при воздействии на животных гипотермии различной длительности и глубины. Основным выводом этого раздела является то, что на начальных стадиях (умеренная кратковременная гипотермия и пролонгированная гипотермия длительностью до 1 ч) происходит усиление окислительного стресса и снижение уровня и активности компонентов антиоксидантной системы митохондрий. В то же время пролонгирование гипотермии способствует нормализации исследуемых маркеров.

Вторая часть результатов исследования, в которую также можно выделить три главы, посвящены структурно-динамическим перестройкам мембраны печени крыс, содержащихся в условиях гипотермии различной глубины. По анализу суммарной флуоресценции митохондрий автор говорит о том, что в условиях гипотермии наблюдается

изменение белок-липидных взаимодействий в мембранах митохондрий. С использованием флуоресцентного зонда пирена Саимат Ибрагимовна продемонстрировала, что в условиях гипотермии наблюдается снижение микровязкости липидов в митохондриальных мембранах. Автор показал, что кратковременная гипотермия приводила к снижению флуоресценции зонда 1,8-АНС. Это может свидетельствовать о том, что происходит снижение количества гидрофобных участков мембранных белков, доступных к связыванию с этим зондом. При этом в условиях длительной и глубокой гипотермии животных эти изменения были менее выражены.

Следующая часть результатов исследования посвящена анализу функциональной активности митохондрий печени при содержании крыс в условиях гипотермии различной длительности и глубины. Автор обнаружил, что в условиях гипотермии (особенно умеренной гипотермии (1 час, 30°C), значительно увеличиваются все скорости дыхания митохондрий при использовании как субстратов I, так и II комплексов дыхательной цепи. Параллельно с этим происходит снижение параметров окислительного фосфорилирования – P/O и дыхательного контроля. В условиях более глубокой или продолжительной гипотермии происходило снижение скоростей дыхания митохондрий. Кроме того, автор оценил образование митохондриальной поры в условиях гипотермии животного. Показано, что в условиях кратковременной гипотермии происходят процессы, изменяющие чувствительность митохондрий к ионам Ca^{2+} . Однако более длительная гипотермия приводила к адаптационным процессам, в результате чего происходит восстановление чувствительности митохондрий к данному иону.

Раздел «Обсуждение» посвящен анализу полученных в работе результатов. Общим выводом из данной диссертации является то, что в условиях кратковременной или умеренной гипотермии преобладают негативные механизмы, связанные с развитием окислительного стресса и митохондриальной дисфункцией. Помимо этого, снижается микровязкость митохондриальных мембран. Вместе с тем, более продолжительная или глубокая гипотермия вызывает адаптационные процессы и развитие окислительного стресса и митохондриальная дисфункция становятся менее выраженными. Важно, что этот раздел содержит схему, в которой автор представляет анализ полученного материала.

Раздел «Заключение» обобщает полученные в работе результаты. Выводы оригинальны.

Научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования.

Полученные при выполнении диссертационной работы Хизриевой С.И. данные расширяют представления о функционировании митохондрий при низких температурах тела гомойотермных животных. Продемонстрировано, что, несмотря на то что в условиях

краткосрочной гипотермии наблюдаются развитие митохондриальной дисфункции и окислительного стресса, более длительная и глубокая гипотермия приводит к стимуляции адаптационных процессов и восстановлению работы митохондрий.

Полнота изложения положений и результатов в публикациях автора

Все положения и результаты экспериментальной работы диссертации отражены в автореферате и были опубликованы в рецензируемых научных изданиях. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 6 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК. Материалы работы достаточно полно представлены и обсуждены на всероссийских конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Пожелания, вопросы и замечания.

Давая положительную оценку полученным результатам выводам, хотел бы остановиться на некоторых моментах, которые вызывают вопросы и замечания.

1. Некоторые главы литобзора выглядят как адаптация учебника по биоэнергетике и не несут понимания, для чего они написаны. Это хорошо для лекций для студентов, но не в качестве главы для диссертации. С другой стороны, скудно описан кальциевый транспорт, структура Ca^{2+} унипортера. Эти данные, а также анализ литературы по митохондриальной поре нельзя назвать свежими. Автор не описывает современные представления о структуре поры и ее функциях, что известно про влияние гипотермии на различные ткани и их митохондрии.

2. В разделе «Материалы и методы исследования» ряд методов описан не очень подробно. Это касается создания гипотермических условий, описания методов работы с мембранами. К большинству методов отсутствует ссылка на литературу, что заставляет читателя проводить поиск для понимания, зачем тот или иной метод был использован в работе. С другой стороны, ряд методов избыточен, а также не очень корректно описан. Если уж автор описывает состояния дыхания митохондрий по Чансу, то он должен знать, что у Чанса-Вильямса состояние V5 описывалось как состояние в отсутствие кислорода, а не как дыхание в присутствии разобщителя. Почему автор использовал в качестве субстрата I комплекса дыхательной цепи лишь глутамат (без малата или пирувата), а при исследовании дыхания на сукцинате не использовал ротенон? Это все осложняет интерпретацию данных.

3. Известно, что снижение температуры приводит к увеличению микровязкости липидного бислоя. С чем, по мнению автора, связано наблюдаемое им снижение микровязкости, если сам автор предполагает, что синтез липидов, содержащих большее количество ненасыщенных жирных кислот, маловероятен за время действия гипотермии?

4. К чему могут приводить изменения структуры белок-липидных взаимодействий при гипотермии, полученные в работе, и почему в условиях глубокой гипотермии происходит стабилизация этих процессов?

5. Почему автор выбрал такие условия для набухания митохондрий как 420 мкМ Ca^{2+} и 3 мМ Pi ? Как автор проверял, что происходит открытие именно белковой поры? Сюда же относится и то, что автор измерял кальциевую емкость митохондрий по поглощению кислорода. Метод хоть и применяется, но не является классическим для данного анализа. В случае не совсем классических условий эксперимента трудно интерпретировать полученные данные, более того, они могут свидетельствовать не совсем о тех процессах, которые описывает автор.

6. Раздел «Обсуждение результатов» должен содержать в первую очередь анализ полученных результатов, в котором излагается, почему происходят те или иные изменения. В настоящем виде он немного отвлекает от основной мысли диссертации.

Критические комментарии к диссертационной работе вызваны интересом к представленным материалам и предложенным объяснениям.

Таким образом, следует признать, что диссертационная работа С.И. Хизриевой содержит научные результаты, имеющие важное значение для развития биохимии, биофизики и клеточной биологии. Содержание автореферата и опубликованных статей полностью отражает содержание диссертации. Считаю, что диссертационная работа Саимат Ибрагимовны Хизриевой на тему «Интенсивность оксидативного стресса и структурно-функциональное состояние мембран митохондрий печени крыс при гипотермии» соответствует требованиям, изложенным в п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Официальный оппонент

Проректор по инновационной деятельности,
профессор кафедры биохимии,
клеточной биологии и микробиологии
ФГБОУ ВО «Марийский
государственный университет»



доктор биологических наук, доцент
Белослудцев
Константин Николаевич

Адрес: 424000, Марий Эл, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 1, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет»

Телефон: (8362)68-80-02

Сайт: www.marsu.ru; e-mail: bekonik@gmail.com

26.10.2023