

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Хизриевой Саимат Ибрагимовны
«ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА
И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ»,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы.

Гипотермия нашла широкое практическое применение в медицине при хирургических вмешательствах, ишемическом инсульте головного мозга, травме спинного и головного мозга, поскольку обладает протективными свойствами и нивелирует негативные последствия различных травм. Защита, обусловленная понижением температуры тела, является результатом снижения скорости метаболических процессов и уменьшения потребности тканей в кислороде и глюкозе. Однако наряду с положительными эффектами гипотермия вызывает ряд нежелательных изменений. Гипотермия приводит к метаболическому ацидозу, увеличению вязкости плазмы крови, снижению деформируемости эритроцитов и затруднению их транспорта через микрокапилляры, увеличению сродства гемоглобина к кислороду, в результате чего наступают гипоксические состояния. Наряду с этим гипотермические состояния сопровождаются увеличенным образованием активных форм кислорода (АФК) с последующим развитием оксидативного стресса. Из литературных данных известно, что начинающаяся гипотермия сопровождается усилением оксидативных процессов, прооксидантный эффект при этом развивается максимально через 1 час. Термостатическая функция организма тесно связана с работой мышц и печени. Последняя, кроме того, является основным органом гомеостатических и метаболических процессов, осуществление которых тесно связано с функционированием митохондрий, которые, в свою очередь, являются продуцентами АФК и одновременно их мишенью. В связи с этим представляется важным и актуальным раскрытие механизмов генерации АФК на различных этапах гипотермии, изучение зависимости гипотермического состояния от функционального состояния компонентов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ).

Цель работы, обоснованность научных положений и выводов.

Цель работы состояла в исследовании взаимосвязи между интенсивностью оксидативного стресса и структурно-функциональным

состоянием мембран митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности и глубины.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Исследовать интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) в митохондриях печени крыс при гипотермии.
2. Исследовать активность ферментов и содержание низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы (АОС) в митохондриях печени крыс при гипотермии.
3. Исследовать интенсивность и спектры собственной флуоресценции мембран митохондрий печени крыс при гипотермии.
4. Исследовать структурно-динамические параметры мембран (микровязкость липидной матрицы, полярность фосфолипидов) митохондрий печени крыс при гипотермии.
5. Исследовать кинетические характеристики связывания флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (1,8-АНС) с митохондриями печени крыс при гипотермии.
6. Исследовать респираторные характеристики митохондрий печени крыс при гипотермии.
7. Исследовать кинетику набухания и кальциевую ёмкость митохондрий печени крыс при гипотермии.

Достоверность полученных результатов.

Диссертант в своей работе применил общепринятые биохимические методы, не теряющие своей актуальности. Для оценки морфофункциональных характеристик митохондрий и для отслеживания изменений в них, вызванных гипотермией животного, проведена сложная работа по выделению митохондрий. В связи с тем, что некоторые из методов (биофизические методы), оценивающих состояние митохондрий, могут быть проведены в течение короткого срока после выделения последних из клеток печени, это усложняет работу и добавляет ценности, так как это позволяет оценить буквально онлайн воздействие гипотермии на состояние митохондрий. Используемые методы позволяют в достаточной степени выполнить поставленные задачи. Результаты, полученные в ходе выполнения довольно широкого спектра процедур и методик, являются хорошей основой для объяснения происходящих при гипотермии изменений в организме животного. Проведенная работа с научной литературой показывает достаточную эрудированность диссертанта. Умозаключения и раскрытие механизмов функционирования митохондрий на основании собственных

результатов и довольно «свежей» литературы не позволяют сомневаться в том, что работа выполнена качественно и позволяет объективно оценить происходящие в организме изменения на молекулярном уровне. Результаты, изящно вплетенные как недостающие звенья в имеющиеся знания о работе митохондрий и системы регуляции редокс-баланса, позволяют логично и понятно объяснить изменения в организме при экстремальном состоянии, а достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Научная новизна.

В данной работе впервые продемонстрировано влияние гипотермии различной глубины и длительности на состояние прооксидантной и антиоксидантной систем, структурно-динамические и функциональные параметры митохондрий печени крыс. Впервые показано, что в митохондриях печени крыс при умеренной кратковременной и пролонгированной до 1 ч гипотермии происходит интенсификация ПОЛ и ОМБ. При этом большинство параметров пероксидации липидов и модификации белков при пролонгированной до 3 ч гипотермии держатся на уровне контрольных значений. Установлено, что умеренная кратковременная гипотермия и ее пролонгирование оказывают значительный эффект на ряд функциональных параметров митохондрий: увеличиваются скорости дыхания и фосфорилирования, изменяются коэффициент окислительного фосфорилирования, чувствительность к ионам кальция и кальциевая ёмкость митохондрий. Обнаружено, что умеренная кратковременная гипотермия и ее пролонгирование снижают микровязкость общих и аннулярных липидов и интенсивность собственной флуоресценции мембранных белков.

Значимость для науки и практической деятельности.

Результаты исследования представляют интерес для понимания механизмов формирования патогенеза холодового повреждения, компенсаторно-приспособительных и адаптивных реакций в митохондриях гомойотермных организмов при низкотемпературном стрессе на молекулярном уровне и на уровне целых органелл. Решение вышеуказанных теоретических проблем может иметь практическое значение для различных медико-биологических приложений, в том числе связанных с адаптацией организма в условиях Заполярья и Крайнего Севера, при выполнении физических нагрузок в экстремальных температурных условиях и в разработке новых криопротекторов и способов предотвращения последствий переохлаждения. Полученные в диссертации результаты уже используются при чтении спецкурсов «Биофизика», «Кинетика и термодинамика

ферментативных реакций», «Биохимия гипометаболических состояний позвоночных» в Дагестанском государственном университете.

Структура и содержание работы.

Диссертация изложена на 159 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, содержащего 274 литературных источника, из них 68 русскоязычных и 206 англоязычных. Работа иллюстрирована 29 рисунками, 6 таблицами и 1 схемой. Содержимое автореферата позволяет без искажений ознакомиться с проведенной диссертантом работой и полученными результатами в полной мере. По результатам работы опубликовано 6 статей в журналах, реферируемых РИНЦ и SCOPUS. Так же у автора имеется 7 публикаций в других сборниках, тезисы докладов. Первая публикация появилась в 2016 году, последняя из включенных в список публикаций по результатам выполненной работы - статья 2023 г.

В обзоре литературы автор подробно характеризует и описывает как физиологические изменения в организме, так и биохимические изменения, происходящие в митохондриях при гипотермии.

В первой главе описано понятие гипотермии у гомойотермных животных, разобраны физиологические и биохимические изменения в организме при гипотермии, оксидативный стресс при гипотермии. Далее автор подробно описывает структуру и функции митохондрий, процесс образования АФК в клетке и в митохондриях. Очень подробно описаны строение мембран органелл, структура дыхательной цепи митохондрий, сопряжение дыхательной цепи с окислительным фосфорилированием, механизмы регуляции кальциевого гомеостаза митохондриями, система объемной регуляции и динамичность митохондрий. Очень важно, что литературный обзор завершает короткое резюме, выделяя самое важное и помогая понять и выстроить логику изложения материала автором.

Вторая глава содержит описание объекта исследования, моделирование гипотермии. Описаны препаративные методы, биохимические и биофизические методы, методы статистической обработки.

Третья глава содержит результаты собственных исследований. Первые три раздела объединяют данные по изучению реакции антиоксидантной системы (АОС) митохондрий с применением ряда биофизических методов исследования митохондрий.

Автором предложены механизмы изменения показателей АООС митохондрий при гипотермии. Высказано мнение о центральной роли глутатиона, который выступает не только в качестве ловушки АФК и восстановителя липопероксидов, но также участвует в поддержании тиолового статуса белков митохондрий. Между содержанием глутатиона и Р/О сукцинат-зависимого дыхания выявлена положительная корреляция. Положительная корреляция обнаружена также между содержанием глутатиона и дыхательным контролем по Ларди - как глутамат-зависимого, так и сукцинат-зависимого дыхания. Исходя из этого, автор предполагает, что снижение уровня глутатиона может способствовать активации процессов окислительной модификации липидных и белковых компонентов мембраны митохондрий и привести к соответствующему снижению показателей Р/О, дыхательного контроля, чувствительности к разобщителю 2,4-ДНФ.

Исследование биофизическими методами структурных изменений в митохондриях при гипотермии показало изменение динамики связывания флуоресцентных зондов. Автором высказаны предположительные изменения в структуре липидов и белков мембран митохондрий. Проведена отдельная работа по исследованию связывания 1,8-АНС зонда с белками мембран митохондрий. Предложено 2 сайта связывания зонда на основании концентрационной зависимости флуоресценции последнего. Это помогло автору дополнить и объяснить данные, полученные при исследовании показателей оксидативного стресса.

Исследование ЭТЦ митохондрий привело к заключению, что на начальных этапах гипотермии наиболее существенные изменения происходят в функционировании комплекса I дыхательной цепи, что приводит к увеличению скорости дыхания митохондрий и соответствующему возрастанию продукции АФК. По предположению автора высокий уровень глутамат-зависимого дыхания и низкие значения дыхательного контроля при 3-часовой гипотермии указывают на усиление протонной проводимости и снижение разности электрохимических потенциалов на внутренней мембране митохондрий, что является одним из путей подавления продукции АФК в митохондриях. Усиление сукцинат-зависимого дыхания при этом способствует поддержанию энергообразующей функции митохондрий.

Полученные автором экспериментальные данные указывают на повышение неспецифической проницаемости и снижение кальций-аккумулирующей способности митохондрий на начальных этапах гипотермии из-за развивающегося оксидативного стресса. Установленные автором корреляции доказывают важную роль системы глутатиона, которая

преимущественно обеспечивает адаптацию организма к воздействию гипотермии при пролонгировании ее действия.

Несомненным плюсом является то, что на основании собственных данных автор предложил схему оксидативного повреждения в митохондриях печени при гипотермии.

При ознакомлении с диссертацией возникли следующие **замечания**.

В таблице 3, где приведены кинетические параметры связывания 1,8-АНС с митохондриями печени крыс в норме и при гипотермии 3-4-значные числа указаны с 1 знаком после запятой, такая точность не нужна. В этой же таблице количество знаков после запятой в средних значениях и в стандартных отклонениях не совпадает. В таблице 4 средние значения приведены, в основном, с 2 знаками после запятой, тогда как стандартные отклонения – с 1 знаком. Изменение скорости дыхания митохондрий в разных состояниях указано в % с десятичными долями. А если изменение выражено в разгах, то указаны в некоторых случаях сотые доли. Такая точность не нужна. В некоторых случаях автор указывает уровень значимости с точкой, в других случаях с запятой:

В разделе 3.8 не приведены значения кинетики и скорости набухания Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий, а в таблице 5 нет данных Ca^{2+} -аккумулирующей способности митохондрий для кратковременной глубокой гипотермии. Хотя в выводе 3 упомянуто, что кратковременная глубокая гипотермия обуславливает снижение кальциевой ёмкости и скорости набухания митохондрий.

В списке сокращений отсутствует ДЛДГ, хотя этот фермент упоминается несколько раз в виде аббревиатуры (вероятно, это дигидролипидегидрогеназа).

Химические формулы в некоторых случаях приведены с несоблюдением форматирования подстрочных знаков: KN_2PO_4 .

Автор сравнивает значения показателей каждой точки с интактным контролем и с другими временными точками гипотермии. Это мешает восприятию анализа. Полагаю, что сравнение только с интактным контролем позволяет уловить динамику показателей и удержать ее во внимании.

Кратковременная умеренная гипотермия достигалась в течение 30 минут, при этом температура организма постоянно изменялась, в отличие от пролонгированной 1- и 3-часовой гипотермии. Так что эта точка качественно отличается от двух последующих. Возможно, ее можно сравнивать только с глубокой гипотермией, где также происходило постоянное снижение температуры тела.

Диссертант употребляет оборот: «гипотермия привела» к снижению показателя или к повышению уровня/значения показателя при пролонгировании гипотермии. Но показатель – это результирующий вектор взаимодействия физического фактора и организма. Поэтому, на мой взгляд, несколько корректнее было бы писать «показатель изменился» на фоне гипотермического воздействия, или «произошло понижение/повышение значения показателя».

Вопросы диссертанту.

1) В гомогенатах митохондрий определяли общую СОД. Мп-СОД содержится в матриксе, в межмембранном пространстве митохондрий имеется Cu-, Zn-СОД. Перечислены ингибиторы, которые могут быть использованы для разделения их активности, но они не использованы, почему?

2) На странице 100 в обсуждении фигурирует фермент каталаза, который имеет более высокую каталитическую активность по отношению к пероксиду водорода по сравнению с глутатионпероксидазой. Активность фермента довольно легко измеряется, почему не провели это измерение?

3) Для статистической обработки данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Правомерно ли применять средние значения и стандартные отклонения для выражения результатов в таком случае?

4) Группа взаимосвязанных вопросов по специфике экспериментальной модели. Способ достижения гипотермии, использованный диссертантом – общепринятая методика? Имеются ли другие способы и другие скорости достижения гипотермии? Имелась ли техническая возможность проводить охлаждение организма медленнее, либо в боксе без ограничения подвижности? Являются ли изменения, происходящие в митохондриях печени при гипотермии, специфическими? Вызваны ли эти изменения стрессом иммобилизации или исключительно холодным стрессом? К какому экстремальному состоянию человека близка выбранная вами модель гипотермии?

Заключение. В диссертационном исследовании Хизриевой С.И. содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития теоретических представлений и практических методов экспериментальной биохимии. Диссертация представляет собой завершённое научное исследование, выполненное автором самостоятельно и на высоком уровне. Полученные автором результаты являются новыми, обоснованными и достоверными. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

По актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных данных представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Хизриева Саимат Ибрагимовна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент: старший научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

кандидат биологических наук



Новожилов Артемий Викторович

Подпись к.б.н. Новожилова А.В. заверяю:

Ученый секретарь ИЭФБ РАН

«09» 11 2023 г.



Е.И. Гальперина

Адрес ИЭФБ РАН: 194223, г. Санкт-Петербург, просп. Тореза, д.44.

Телефон: (812) 552-7901, факс: (812) 552-3012

e-mail: office@iephb.ru; <http://www.iephb.ru>