

ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических

наук Фирсова Александра Михайловича

на тему: «Пермеабиллизация бислойных липидных мембран,

индуцированная пероксидазной активностью цитохрома с»

по специальности 03.01.02 – «биофизика»

Актуальность темы. Диссертационная работа А.М. Фирсова посвящена изучению мембранных процессов в модельной системе, включающей липидные бислои с кардиолипином, растворимый цитохром *c* и перекись водорода. Выбор такой тройной системы не случаен: все эти компоненты повсеместно присутствуют в мембранах митохондрий и в определенных условиях реагируют между собой, вызывая драматические последствия для клетки. Отрицательно заряженный липид кардиолипин представляет один из основных липидов митохондрий. Главная функция цитохрома *c* в митохондриях – перенос электронов между комплексами III и IV дыхательной цепи и генерация электрохимического градиента протонов. Известно, что перенос электронов по ЭТЦ митохондрий сопровождается образованием побочных продуктов – активных форм кислорода (АФК). В присутствии АФК, в частности перекиси водорода, у цитохрома *c* проявляется вторая, не менее важная функция – его участие в перекисном окислении липидов и индукции апоптоза. Актуальность работы определяется тем, что выбранная модельная мембранная система позволяет изучать фундаментальные клеточные процессы, лежащие в основе опосредованного митохондриями апоптоза. Программируемая гибель клеток (апоптоз) составляет неотъемлемую часть нормального развития и функционирования любых организмов, а его нарушения вызывают целый спектр физиологических последствий и заболеваний.

Научная новизна. Реакции цитохрома *c*, кардиолипина и перекиси водорода уже не раз привлекали внимание. В работах Ю.А. Владимирова, В.Е. Кагана и других авторов установлено, что кардиолипин активирует пероксидазную активность цитохрома *c*, т. е. индуцирует перекисное окисление липидов; в лаборатории В.Ф. Антонова показано, что перекисное окисление липидов повышает проводимость бислойных липидных мембран, не приводя к их полному разрушению (т.н. «мягкая» порация). Нарушение целостности мембран может вызывать выход цитохрома из митохондрий при инициации апоптоза. Согласно одной из гипотез, выходу цитохрома *c* в цитозоль предшествует его встраивание в мембраны с образованием широких каналов, достаточных для прохождения белка с мол. массой ~12 кД и радиусом 1.7 нм. Вместе с тем, барьерные и канальные свойства кардиолипин-содержащих мембран в присутствии цитохрома *c* и перекиси водорода не были подробно изучены. Этот пробел восполнен в данной работе. Научная новизна состоит в том, что впервые показаны нарушения мембранной проницаемости липосом под действием пероксидазной активности, проявляемой цитохромом *c* в контакте с кардиолипином.

В работе подробно проанализированы взаимодействия цитохрома *c* и анионных фосфолипидов с перекисью водорода и выявлены факторы, которые контролируют протекание отдельных стадий, вызывая их ускорение или замедление. Установлено, что повышение проницаемости липидных мембран в исследуемой системе связано с образованием липид-белковых мембранных пор, и оценены размеры пор. С помощью ингибиторов удалось управлять отдельными стадиями процесса, что говорит о правильном понимании механизма повышения проницаемости мембран и подтверждает достоверность сделанных выводов.

Структура диссертации. Работа построена по традиционному плану. Во «Введении» обрисовано современное состояние проблемы и четко сформулированы цели и задачи исследования. В «Обзоре литературы» подробно описаны строение и основные функции цитохрома *c*. Известно,

что в митохондриях цитохром *c* связан — частично за счет электростатических взаимодействий — с наружной поверхностью внутренней мембраны. Однако сведения о глубине погружения цитохрома в мембрану, о расположении жирнокислотных цепей в молекуле белка и о структурно-функциональных различиях свободного и связанного цитохрома *c* весьма противоречивы. Предполагают, что в сочетании с липидами цитохром *c* способен формировать трансмембранные тороидальные поры. Образованию пор способствуют липиды с разной геометрией молекул, образующие бислои с положительной и отрицательной кривизной. Обзор служит хорошей основой для планирования опытов и обсуждения собственных результатов.

Адекватность методов исследования. Глава «Материал и Методы» представляется особенно важной; этот раздел говорит о разнообразии и совершенстве используемого оборудования и о высоком научном уровне исследования. Работа выполнена в лаборатории, которая известна и в нашей стране и за рубежом. Успеху способствовал удачный выбор объекта — униламеллярные липосомы диаметром ≤ 100 нм, приготовленные адекватным методом (с помощью мини экструдера и поликарбонатных фильтров) из очищенных липидов и их смесей. Липосомы готовили из липидов с насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами с разной длиной ацильной цепи. Применяли отработанные методики загрузки липосом и гель-фильтрации на колонке для отмывания липосом от несвязанного красителя.

Для изучения проницаемости липосом выбраны высокочувствительные флуоресцентные методы. Один из них основан на разгорании флуоресценции кальцеина и карбоксифлуоресцеина при вытекании из липосом во внешний раствор и снятии концентрационного тушения. Другой оригинальный метод — флуоресцентная корреляционная спектроскопия — основан на анализе флуктуаций флуоресценции. К тому же этот метод (ФКС) позволил понизить концентрации загружаемого красителя, сократить

объемы образцов и расходование реагентов.

Для обработки данных использован начальный участок автокорреляционной кривой (в области малых времен корреляции), который отражает долю вышедшего из липосом красителя. Исходя из этого, часть данных представлена в виде диаграмм для свободной фракции – параметра «альфа». Вместе с тем, вполне оправдано и изображение полных автокорреляционных кривых, так как они наглядны и облегчают восприятие материала.

В параллельных опытах липосомы использовали для измерений пероксидазной активности и способности связывать цитохром *c*. Показателем пероксидазной активности служила хемилюминесценция люминола и флуоресценция резорфина в присутствии реагента Amplex Red. О связывании цитохрома с мембранами липосом судили с помощью метода изотермической калориметрии (по тепловому эффекту этой реакции), по осаждению цитохрома *c* при центрифугировании после его связывания с липосомами, и по тушению флуоресценции пирен-меченого липида. В дополнение к этому, проводили измерения токов через плоские липидные бислои, что позволило выявить одиночные каналы в мембране в присутствии цитохрома *c* и перекиси водорода.

Основные полученные результаты и их значимость. Основу диссертационной работы составляет обнаруженная ответная реакция смеси кардиолипид-содержащих липосом и цитохрома *c* на добавку перекиси водорода. Такая добавка «дырявит» липосомы и вызывает утечку красителей, которые в норме через мембрану не проникают (кальцеин, карбоксифлуоресцеин). Условия проведения опытов были оптимизированы: определены концентрации белка и перекиси, вызывающие наибольшее повышение проницаемости, показано, что замена природного кардиолипина (КЛ) на КЛ с насыщенными жирными кислотами предотвращает утечку флуорофора. Экранирование поверхностного заряда мембран и белка замедляло выход красителей. Обнаружено, что карбоксифлуоресцеин в

отсутствие липидов быстро выцветает под действием перекиси и цитохрома с (вследствие пероксидазной реакции), тогда как структурно близкий краситель кальцеин, а также сульфородамин Б в аналогичных условиях не выцветают. Эти флуорофоры и были выбраны в качестве предпочтительных зондов для изучения барьерных свойств мембраны липосом.

Многие результаты получены методом ФКС. С помощью этого метода (на основе конфокальной микроскопии) показана важная роль КЛ и ненасыщенных жирнокислотных цепей в пермеабиллизации мембран под действием цитохрома и H_2O_2 : при отсутствии КЛ в липосомах из азолектина их проводимость оставалась на исходном низком уровне. Утечка флуорофора через мембраны с природным ненасыщенным КЛ снижалась при замене других ненасыщенных липидов на насыщенные, но наиболее сильное подавление утечки отмечено при замене природного ненасыщенного КЛ на КЛ с насыщенными жирными кислотами. О главной роли КЛ в пермеабиллизации мембран говорят также измерения проводимости плоских БЛМ, в которых показано, что замена природного КЛ, содержащего по две двойные связи в ЖК остатках, на КЛ с одной двойной связью вдвое снижает проводимость мембран в присутствии H_2O_2 и цитохрома, а при замене на полностью насыщенные ЖК остатки проводимость остается низкой, независимо от действия перекиси и цитохрома.

С помощью трех различных методов выявлено связывание цитохрома с с липосомами при смешивании компонентов, что проявляется по тушению флуоресценции меченого липида вследствие миграции энергии на цитохром с, в осаждении белка вместе с липосомами при центрифугировании, а также по тепловым эффектам в реакции связывания. Из анализа выделения тепла как функции молярного соотношения белок–липид определены термодинамические характеристики связывания, включая константу равновесия.

Пермеабиллизация мембран коррелировала с интенсивностью

перекисного окисления липидов (ПОЛ) и со степенью связывания цитохрома *c* с липосомами. Условием протекания ПОЛ было присутствие в смеси цитохрома *c* и перекиси водорода, а также отсутствие антиоксидантов (Тролокс). Все это доказывает роль пероксидазной активности цитохрома *c* в пермеабиллизации мембран.

Повышение мембранной проницаемости блокировалось в присутствии цианида, т.к. связывание цианида предположительно мешает взаимодействию H_2O_2 с гемовым железом. Этот вывод подтвержден контрольными опытами, в которых проверяли возможность разрушения гема под действием H_2O_2 и каталитическое действие свободного железа на окисление мембранных липидов. Версия о влиянии свободного железа была исключена. Антибиотик миноциклин (200 мкМ) полностью ингибировал утечку красителя из липосом в присутствии цитохрома и H_2O_2 , предотвращал развитие ПОЛ и ингибировал связывание цитохрома *c* с липосомами. Такое действие объяснено конкуренцией между КЛ и миноциклином за связывание с белком.

Впервые подробно изучено влияние проникающих антиоксидантов – ионов SkQ и Mito-Q на утечку красителя из липосом, пероксидазную активность цитохрома *c* и связывание этого белка с липосомами. Показано, что все перечисленные процессы замедляются в присутствии проникающих ионов. Предположено, что комплексное действие липофильных антиоксидантов основано на подавлении связывания цитохрома *c* мембранами.

Замечания по диссертационной работе носят частный характер и приведены ниже.

(1) Анализируя влияние липофильных антиоксидантов на тепловые эффекты при внесении цитохрома в суспензию липосом, автор предполагает, что ионы SkQ не нарушают электростатических взаимодействий цитохрома с мембраной, а препятствуют только погружению белка в липидный бислой. На мой взгляд, это предположение

не очевидно. Будучи липофильными и встраиваясь в мембрану, эти катионы могут понизить плотность фиксированных отрицательных зарядов и ослабить кулоновское притяжение цитохрома *c*. Калориметрических данных возможно недостаточно для окончательного вывода.

(2) Наибольший интерес к ионам SkQ и их аналогам связан с их движением через мембраны в электрическом поле (под влиянием отрицательного эл. потенциала митохондрий). В связи с этим было бы интересно проверить действие этих ионов на исследуемые параметры при сдвигах мембранного потенциала липосом, хотя техническая сторона таких опытов может оказаться весьма сложной.

(3) Автор придерживается гипотезы о том, что встраивание цитохрома *c* в мембрану сопряжено с образованием каналов и открыванием пути для проникновения других молекул цитохрома *c*. Косвенные подтверждения в пользу такой возможности в работе получены. Размер образуемых мембранных пор (~5 нм) достаточен для проникновения молекул цитохрома *c*. В связи с этим возникает вопрос, делались ли попытки загрузить цитохром *c* в липосомы и выявить специфичное (индуцируемое перекисью водорода) выведение цитохрома *c* из везикул в раствор. Казалось бы, все необходимые методы для этого имеются. При отсутствии прямых данных о выходе цитохрома из везикул в модельной системе, гипотеза о том, что цитохром *c* сначала связывается в больших количествах с мембраной, а затем сам же выходит в раствор по собственным каналам звучит недостаточно убедительно. Отметим, что эта гипотеза выдвинута до соискателя другими авторами.

Общая характеристика диссертационной работы. Отмеченные замечания не влияют на оценку работы в целом и ни в коей мере не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация содержит богатый научный материал и информативный обзор литературы; хорошо написана и иллюстрирована. Материалы диссертации опубликованы в трех статьях в международных журналах с импакт-фактором от 2.3 до 3.5 и

представлены на международных и российских конференциях и съездах. Автореферат отражает содержание диссертации. Выводы в полной мере обоснованы.

Учитывая актуальность, новизну, объем и высокий научный уровень проведенного исследования, можно заключить, что рассматриваемая диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.02 – «биофизика» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Фирсов Александр Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

Профессор кафедры биофизики Биологического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

БУЛЫЧЕВ Александр Александрович

Контактные данные:

тел.: +7(915)4108961, e-mail: bulychhev@biophys.msu.ru

Доктор биологических наук по специальности:

*Подпись руки д.б.н., проф. А.А. Булычева заверено
д.б.н. д-р.т. Н.Н. Кузнецова*

29.03.2018



03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр.12

МГУ имени М.В.Ломоносова,

Биологический факультет, кафедра биофизики

Тел.: +7(495)9393503; e-mail: bulychhev@biophys.msu.ru

Подпись сотрудника Биологического факультета МГУ

А.А.Булычева удостоверяю:

Ученый секретарь факультета

Е.В. Петрова

