

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию 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»

Биохимическая программа самоуничтожения клетки – апоптоз – является одной из наиболее интригующих глав современной биохимии. Программируемая гибель клеток является важнейшей функцией многоклеточных организмов, позволяющей им осуществлять контроль развития и обновления отдельных органов и тканей. В то же время, понимание закономерностей апоптоза важно для понимания закономерностей борьбы с онкологическими заболеваниями, а также для изучения способов замедления старения. В настоящей работе делается еще один важный шаг в понимании биофизических и биохимических механизмов запуска апоптоза: автором получены убедительные и хорошо согласующиеся между собой данные, свидетельствующие о том, что цитохром с в присутствии перекиси водорода способен расщеплять ненасыщенные двойные связи в молекуле кардиолипина, формируя вследствие этого пору в липидном бислое. Высвобождение цитохрома с из межмембранного пространства митохондрий приводит к целой цепи событий, приводящих к формированию апоптосомы и запуску апоптоза. До настоящего времени прямые доказательства возможности проявления цитохромом с пероксидазной активности по отношению к связанному с ним кардиолипину отсутствуют в литературе, хотя в некоторых работах сходные предположения уже высказывались. Это говорит о высокой актуальности защищаемой работы и свидетельствует о новизне полученных результатов.

Работа построена традиционным образом. В обзоре литературы автор подробно описывает структуру и свойства цитохромов с, выделенных из

различных источников. Далее автор дает представление о роли цитохрома *c* в электрон-транспортной цепи, его внутриклеточной локализации и участии в апоптозе. Во второй главе обзора литературы автор останавливается на работах, посвященных взаимодействию цитохрома *c* с липидными мембранами. Известно, что катионные пептиды и белки, подобные цитохрому *c*, способны с высокой эффективностью адсорбироваться на отрицательно заряженных липидных бислоях. Причем показано, что при связывании с кардиолипином конформация цитохрома меняется и железо переходит из шести-координированного низкоспинового состояния в пяти-координированное состояние с высоким спином. При этом белок принимает частично раскрытую конформацию и становится более подвержен взаимодействию с окислителями и восстановителями. Интересно, что аналогичные изменения в структуре цитохрома *c* наблюдаются при его адсорбции на углеродных нанотрубках. Это означает, что формирование электростатических связей с анионными группами кардиолипина не является необходимым условием для приобретения полимером высокоспинового состояния. В главе, посвященной пермеабиллизации мембран под действием цитохрома *c*, подробно и критично анализируется литература, посвященная закономерностям изменениям мембранной проницаемости под действием цитохрома *c*. Из этой главы следует, что однозначных доказательств о решающей роли пероксидазной активности цитохрома *c* в вызываемом этим белком повышении проницаемости бислойных мембран в литературе до сих пор не получено. В заключительной главе обзора литературы, посвященной формированию белково-липидных пор под действием пептидов, приводится литература, которая, хоть и не имеет непосредственного отношения к цитохрому *c*, оказывается очень важна для правильного понимания предполагаемых автором гипотетических структур, возникающих под действием цитохрома *c* в присутствии перекиси водорода.

Впечатляет большой арсенал методических приемов, использованных автором для доказательства предлагаемого им механизма. В работе было

использовано 3 метода исследования проницаемости липосомальных мембран, а также дополнительно к ним аналогичные явления были исследованы на плоских липидных мембранах. Связывание цитохрома *c* с мембранами также было изучено тремя независимыми методами включая такие современные методы как флуоресцентная корреляционная спектроскопия и изотермическая титрационная калориметрия. Наконец, пероксидазная активность цитохрома *c* также была померена двумя независимыми методами. Следует подчеркнуть, что столь тщательный и даже дотошный подход является характерной чертой исследовательской группы, возглавляемой Юрием Николаевичем Антоненко. Все методики написаны четко и настолько подробно, что их можно воспроизвести в любой биофизической лаборатории.

Переходя к основным результатам работы, следует сказать, что автору удалось доказать способность цитохрома *c* вызывать пермеабиллизацию липидных мембран в присутствии пероксида водорода. Оказалось, что наибольший эффект на проницаемость мембран по отношению к кальцеину вызывается при 1.5 мМ пероксида, а при дальнейшем увеличении концентрации пероксида он уменьшается. Можно предположить, что высокие концентрации пероксида окисляют остаток метионина в цитохроме, меняя при этом состояние железа. При использовании в качестве индикаторного красителя карбоксифлуоресцеина также наблюдалось вытекание красителя под действием цитохрома *c* и пероксида водорода. Однако оказалось, что сами молекулы карбоксифлуоресцеина могут окисляться под действием цитохрома *c* в присутствии пероксида водорода, что указывает на участие активных форм кислорода в наблюдаемых процессах.

Использование флуоресцентной корреляционной спектроскопии позволило очень четко оценить долю липосом, пермеабиллизуемых под действием системы цитохром *c*/пероксид водорода. Оказалось, что по мере роста концентрации цитохрома *c* эта величина слабо увеличивается, затем начинает расти гораздо быстрее, а затем скорость изменения доли пермеабиллизированных липосом с увеличением концентрации полимера опять

снижается. При этом общие закономерности, полученные методом ФКС сходны с результатами, полученными по скорости вытекания кальцеина.

Для ответа на вопрос, какие именно молекулы, присутствующие в бислойных мембранах, подвергаются окислению, автор исследовал влияние степени ненасыщенности мембран на их пермеабиллизацию под действием цитохрома и пероксида водорода. Как и ожидалось, замена природных фосфатидилхолина и кардиолипина на их насыщенные аналоги приводила к полному или частичному (в случае фосфатидилхолина) подавлению пермеабиллизации. Это однозначно указывает на то, что именно окисление ненасыщенных липидов является основной причиной цитохром- и пероксид-зависимой пермеабиллизации мембран.

Какая химия лежит в основе данных процессов? А priori можно было бы сказать, что в системе, содержащей ионы железа, пероксид водорода должен разлагаться с образованием гидроксил-радикалов и супероксид-радикалов. Результаты, полученные автором, хорошо подтверждают это предположение. Действительно, химия Фентона предполагает окисление большинства ненасыщенных соединений или веществ, содержащих фенольные или анилиновые группы. А автор наблюдает окисление не только ненасыщенных липидов, но и карбоксифлуоресцеина. В ходе фентоновского окисления железо не расходуется, но, поскольку активные частицы являются промежуточными продуктами, реакции, как правило имеют лаг-период. А в экспериментах по вытеканию кальцеина в работе были получены кинетические зависимости, имеющие ярко выраженный лаг-период. Еще одно подтверждение этого механизма было получено с помощью измерения хемилюминесценции люминола. Известно, что в присутствии двухвалентного железа и пероксида водорода люминол окисляется с высвобождением молекулы азота, что сопровождается выделением кванта света. Оказалось, что цитохром с также эффективно катализирует эту реакцию.

Наконец, окисление 3,7-диокси-N-ацетилфеноксазина под коммерческим названием Amplex Red также хорошо подтверждает участие гидроксил-

радикалов в процессах, катализируемых цитохромом *c*. Все эти результаты хорошо увязываются с ролью активных форм кислорода в регуляции митохондриальных процессов. С другой стороны, автором работы впервые показано, что именно цитохром *c* может инициировать процессы перекисного окисления, приводя к образованию поры в липидной мембране.

Важнейший аспект, связанный с действием цитохрома на мембраны – его связывание. Этот процесс хорошо исследован в литературе. Известно, что цитохром *c* образует прочный комплекс с кардиолипином, причем два углеводородных радикала кардиолипина проникают в гидрофобные карманы белка, а два – остаются заякоренными в липидной мембране. В работе для изучения связывания цитохрома *c* с липидным бислоем, содержащим кардиолипин, использовали три способа регистрации связывания: метод центрифугирования липосом при $50000\times g$, флуоресцентный подход, основанный на тушении флуоресценции пирен-меченого липида, и метод изотермической титрационной калориметрии. Следует отметить, что эта часть работы также выполнена на современном и высоком уровне. Полученные результаты указывают на то, что именно связывание цитохрома *c* с липидным бислоем опосредует его воздействие на проницаемость мембран.

Радикальная природа процессов, происходящих в присутствии пероксида водорода и цитохрома *c*, была однозначно показана при использовании антиоксидантов. Оказалось, что добавление кверцетина, ионола или тролокса значительно снижает опосредованное цитохромом и пероксидом вытекание красителя из липосом. Интересно, что антиоксиданты не подавляли вытекание полностью. Это может указывать на то, что процессы окисления липида проходят в непосредственной близости от белка, и молекулы антиоксидантов, испытывающих диффузионные и стерические ограничения, оказываются недостаточно эффективны для подавления этих процессов. При более гидрофобные антиоксиданты SkQ1 или MitoQ оказываются более эффективными. Вместе с тем, использование высокой концентрации тролокса

также полностью подавляло пермеабилизацию мембран под действием цитохрома и пероксида водорода.

Очень важный результат был получен в диссертации при сравнении исследуемой системы цитохром *c*/пероксид водорода и неферментативной системы железо/аскорбат, которая также генерирует значительное количество активных форм кислорода. Применение в качестве ингибиторов ЭДТА и цианида позволило получить однозначные доказательства того, что источником активных форм кислорода в случае цитохрома *c* является именно белок, а не свободный гем или ионы железа.

При прочтении работы возникает ряд вопросов и замечаний.

1) Автор очень подробно и тщательно изучает адсорбцию цитохрома *c* на липосомах, содержащих природный полиненасыщенный кардиолипид. В то же время, сродство цитохрома *c* к кардиолипину хорошо известно. В контексте настоящей работы было бы более интересно сравнить сродство цитохрома к насыщенным аналогам кардиолипина, которые автор работы использует в других ее частях. Однако упоминаний о таких экспериментах в диссертации не содержится.

2) Автор предлагает самодостаточный и хорошо подкрепленный экспериментально механизм индукции мембранной проницаемости под действием цитохрома *c*. Можно было бы предположить, что именно такие процессы лежат в основе выхода цитохрома из митохондрий, приводящего к запуску апоптоза. Однако приводимые автором зависимости от концентрации пероксида водорода (например, на рисунке 22, находящемся на 49 странице диссертационной работы) показывают, что наибольший эффект достигается при концентрации пероксида водорода около 1.5 мМ. Известно, что в нормальных клетках концентрация пероксида, как правило, составляет около нескольких десятых долей мкМ. Такие концентрации автором исследованы не были. Не исключено, правда, что локальная концентрация пероксида в митохондриях может быть заметно выше, и тогда предлагаемый в работе механизм вполне может объяснить явления, наблюдаемые в живых клетках.

3) Работа сильно бы выиграла, если бы автор уделил больше внимания формальному описанию кинетики вытекания кальцеина из липосом. Данный процесс характеризуется отчетливо выраженным лаг-периодом. Было бы интересно узнать, чем именно обусловлен этот лаг-период, зависит ли он от связывания белка с мембраной, или скорость-лимитирующая стадия состоит в формировании поры в липидном бислое.

4) В работе отсутствуют данные о том, покидает ли цитохром *c* липосомальную мембрану в результате пермеабилзации или остается связанным с ней в белково-липидной поре. В последнем случае не очень понятно, каким образом пермеабилзация мембраны может объяснить регуляторную роль цитохрома *c* в процессах апоптоза.

Приведенные замечания не снижают научной ценности и значимости представленной работы, а носят характер пожеланий и предложений по ее дальнейшему развитию.

Материалы диссертации опубликованы в 3 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, многократно докладывались на российских и международных научных конференциях. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Кандидатская диссертация Фирсова А.М. является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для биофизики, а именно: показано, что цитохром *c* способен проявлять пероксидазную активность и вызывать вследствие этого образование пор в липидной мембране в присутствии пероксида водорода.

По актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и практической значимости 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.

Считаю, что соискатель Фирсов Александр Михайлович несомненно заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.02 — биофизика.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

МЕЛИК-НУБАРОВ Николай Сергеевич



26.03.18

Контактные данные:

тел.: +7(917)5091585, e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Доктор химических наук по специальности:

02.00.06 — высокомолекулярные соединения

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр.3

МГУ имени М.В.Ломоносова,

Химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений

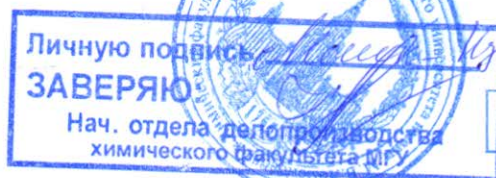
Тел.: +7 (495)9393127; e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Подпись сотрудника Химического факультета МГУ

Н.С.Мелик-Нубарова удостоверяю:

Начальник отдела делопроизводства

Н.С. Ларионова




Ларионова Н.С.