



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

119991, ГСП.-1, г.Москва В-334, ул. Вавилова, 32. Для телеграмм: Москва В-334, ИМБ РАН.; л/с 06319001290 в ОФК по ЮЗАО г.Москвы, т.сч. 40503810300001009007, в Отделении №1 Московского ГТУ Банка России г.Москва 705, БИК 044583001, ИНН. БАНКА 7724189956 ОКПО – 02699501, ОКОНХ - 95110 тел. 135-23-11, 135-11-60; факс 135-14-05

24.10.2016 № 12312-2141

На № _____



УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора федерального государственного
бюджетного учреждения науки
им. В.А. Энгельгардта РАН,
докт.биол.наук, проф. В.Л.КАРПОВ
«11» октября 2016 г.

О Т З Ы В

ведущей организации на диссертационную работу **ЗАХАРОВОЙ ВЛАДЫ ВЯЧЕСЛАВОВНЫ** «Роль митохондрий в нарушении барьерной функции эндотелия, вызванном фактором некроза опухоли», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Митохондрии представляют собой органеллы, в которых проходят многие жизненно-важные процессы клетки, в том числе окислительное фосфорилирование и биосинтез АТФ, цикл Креббса, биосинтез липидов. Система окислительного фосфорилирования наряду с другими ферментами может производить так называемые активные формы кислорода (АФК). АФК представляют собой относительно короткоживущие интермедиаты кислорода, такие как супероксид-анион, гидроксил-радикал. Кроме того, к ним относится и пероксид водорода, который может образовываться из супероксид-аниона и который может превращаться в гидроксил-радикал. Известно, что нарушения многих процессов в митохондриях сопровождаются усилением продукции АФК, что вносит важный вклад в развитие широкого спектра патологий. Кроме того, митохондрии чувствительны и к немитохондриальным процессам, таким как нарушение гомеостаза ионов кальция, нарушения контактов митохондрий с эндоплазматического ретикулума, многим сигнальным каскадам. Соответственно, в настоящее время митохондрии рассматриваются как перспективная мишень для

создания препаратов для терапии разнообразных патологий.

Целью диссертационной работы В.В. Захаровой стало исследование участия митохондрий в функционировании эндотелия при воспалении. Это проведено при использовании митохондриально-направленных антиоксидантов (SkQ1) и мягких разобщителей окислительного фосфорилирования (напр., C12TPP). Другими инструментами являлись классические антиоксиданты и разобщители, такие как Тролокс, N-ацилцистеин и динитрофенол. При помощи данных соединений исследовалось участие митохондрий в регуляции проницаемости эндотелия и перестройке межклеточных контактов эндотелиальных клеток, а также проводилась оценка возможности использования митохондриально-направленных антиоксидантов и мягких разобщителей для предотвращения гибели мышечных в ответ на внутривенное введение провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей (ФНО). Все это бесспорно представляет собой крайне актуальную задачу, так как ее решение не только дает принципиально новые данные о биологии клетки, но и может привести к созданию нового типа лекарственных препаратов для терапии патологий и жизнеугрожающих состояний, связанных с воспалением, то есть имеет и практическое значение.

Диссертация (130 страниц, 2 таблицы, 24 рисунка) построена по стандартному плану, принятому для диссертаций на соискание степени кандидата биологических наук. Она включает разделы "Список сокращений", "Введение", "Цель и задачи работы", "Обзор литературы", "Материалы и методы исследования", "Результаты и обсуждение", "Заключение", "Выводы", "Благодарности" и "Список литературы" (282 цитируемых источника).

Введение диссертационной работы содержит основные сведения об эндотелии и нарушениях его функций при воспалении, участии ФНО в этих нарушениях, активных формах кислорода и митохондриально-направленных антиоксидантов. Именно эти сведения необходимы для понимания диссертации и служат основой как для литературного обзора, так и для результатов самой диссертационной работы. При этом цель исследования и конкретные задачи приведены в виде отдельного небольшого раздела.

Обзор литературы состоит из двух глав, в которых коротко, но достаточно подробно рассмотрены основные данные, необходимые для понимания диссертационной работы ее актуальности и места в области исследований. соответствует тематике работы и вполне информативен. Первая глава посвящена анализу знаний о роли эндотелия в развитии сердечно-сосудистых патологий. В ней рассмотрены основные сведения о синдроме системного воспалительного

ответа, о факторе некроза опухоли и каскадах, которые он вызывает, о эндотелиальной дисфункции. Хочется особо отметить крайне интересный и важный раздел о плотных и адгезионных межклеточных контактах и о белках, их образующих. Во второй главе обзора литературы кратко рассмотрены современные представления об активных формах кислорода, понятиях об окислительном стрессе и дисфункция митохондрий как их наиболее частых причинах. Наконец, в данной главе четко представлены сведения о митохондриально-направленных антиоксидантах и разобщителях окислительного фосфорилирования. Данный обзор не содержит ошибок, в то же время можно задать вопрос: почему автор называет окислительный стресс как одну из причин воспаления, а не его медиатор. Однако следует подчеркнуть, что этот вопрос не является замечанием.

Раздел "Материалы и методы исследования" содержит перечень основных материалов и реагентов, использованных в ходе выполнения диссертационного исследования, а также методик экспериментальной работы как с культурами клеток, так и с лабораторными животными. В частности, в данном разделе приведены методики культивирования клеток, анализа уровней экспрессии генов методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции. Хочется отметить и методики измерения активности матриксных металлопротеиназ 2 и 9 и оценки проницаемости эпителия при помощи фильтров Transwell и флуоресцентного красителя. Наконец, этот раздел содержит и данные о статистическом анализе экспериментальных данных. Следует отметить правильный выбор диссертантом правильных методов статистического анализа. Описание методик достаточно подробное, что обеспечивает их воспроизводимость. Данный раздел имеет лишь несколько незначительных недостатков. Так, хотелось бы видеть информацию о каталожных номерах использованных антител, так как многие производители часто имеют несколько различных антител против многих белков. Кроме того, на стр.57 соединение Hoechst должно иметь в названии и номер, так как существует само слово Hoechst является обозначением целой группы бис-бензоимидазолов. В то же время в биологии используется практически только Hoechst 33342, так что данный недочет является мало существенным. Наконец, придиркой может стать несогласованность падежей в предложении о растворе, содержащего краситель Кумасси (стр. 59).

Раздел "Результаты и обсуждение" является главной частью диссертационной работы. Он представлен шестью подразделами. Первый из них посвящен характеристике клеточной линии эндотелия EA.hy926. Автор показывает их

морфологию, подтверждает экспрессию и локализацию VE-кадгерина (селективный маркер клеток эндотелия), F-актина и β -катенина. Кроме того, продемонстрировано, что фактор некроза опухоли меняет морфологию клеток и разрушает межклеточные контакты, то есть оказывает действие, характерное для воспаления эндотелия. Отдельно хочется отметить грамотно использованную в диссертационной работе систему по оценке проницаемости эндотелия, построенную на основе планшетов Transwell, в которых культивируют клетки эндотелия и пропускают через данный эндотелий флуоресцентно-меченного декстрана. Использование этой системы позволило подтвердить, что ФНО не просто вызывает нарушение контактов эндотелиальных клеток, но и приводит к нарушению функций самого эндотелия. В этой же части выявлено, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 и его фрагмент C12TPP, а также классические антиоксиданты и разобщители окислительного фосфорилирования блокируют действие ФНО на морфологию клеток, плотные контакты между ними и проницаемость эндотелия. Эти эксперименты принципиально важны, так как они указывают на то, что в действии провоспалительного цитокина – ФНО, принимают важное участие активные формы кислорода и митохондрии в частности.

Во второй главе диссертантом исследуются аспекты механизма действия ФНО на эндотелий. В частности, им показано, что действие данного цитокина на уровень VE-кадгерина на поверхности клеток эндотелия не связано с заметным изменением уровня транскрипции его гена, но происходит на посттрансляционном уровне. В частности, ФНО вызывает расщепление VE-кадгерина с образованием растворимого высвобождающегося фрагмента при участии матриксной металлопротеазы 9. Роль последней подтверждена усилением транскрипции ее гена, повышением ее активности в клетках, а также тем, что изменение уровня полноразмерного VE-кадгерина на мембране в ответ на обработку ФНО блокируется ингибиторами матриксной металлопротеазы 9 (MMP9). Опять же, в работе диссертантом найдено, что все эти процессы подавляются, хотя и не полностью, митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1, его фрагментов C12TPP, а также классическими антиоксидантами и разобщителями. К этой части работы можно задать два вопроса: почему различались концентрации SkQ1 и его фрагмента C12TPP, а также что из себя представлял ингибитор MMP9 – MMP9-inhib 1 (подписи к рис. 17 и 18).

В четвертой главе раздела «Результаты и обсуждение» диссертации представлены результаты исследования каскада, отвечающего за индукцию MMP9 в ответ на обработку клеток эндотелия фактором некроза опухолей. Автором найдено,

что это происходит при участии митоген-активируемых протеинкиназ p38 и JNK, а также фактора транскрипции NF-kB.

Пятая глава посвящена исследованию действия митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 и разобщителей C12TPP и ДНФ на летальное действие фактора некроза опухоли на мышей при его внутривенном введении. Данная модель представляется прекрасной для изучения стерильной модели сепсиса, который связан с сильным воспалительным ответом. Диссертант показал, что эти вещества прекрасно защищают мышей от гибели, причем максимальный эффект был отмечен именно для SkQ1. Это четко идентифицирует митохондриально-направленный антиоксидант как потенциальное средство для терапии жизнеугрожающих состояний, связанных с воспалением.

Наконец, в последней главе показаны данные о действии описанных выше соединений на экспрессию белков – молекул адгезии эндотелия. Известно, что при воспалении у клеток эндотелия происходит усиление экспрессии ряда белков, которые отвечают за взаимодействие с клетками иммунной системы – т.н. молекул адгезии. К ним относятся ICAM1 и VCAM, а также хемокина MCP-1 и провоспалительного хемокина интерлейкина 6 (IL6). Автором показано, что у эндотелия аорт мышей, которым вводили фактор некроза опухолей, усиливается экспрессия всех данных белков, тогда введение животным классических или митохондриально-направленных антиоксидантов и разобщителей окислительного фосфорилирования частично ингибируют такую активацию. Все это говорит об участии митохондрий и активных форм кислорода.

В диссертации в целом можно высказать крайне немного замечаний. В основном, они связаны с оформлением работы. Так, несколько удивляет нумерация страниц не внизу, а вверху справа. Но очевидно, что это не ставит под сомнение научную значимость работы, ее выводы, а также не затрудняет ее восприятие. В пользу диссертанта является отсутствие опечаток в тексте.

В.В. Захарова продемонстрировала высокий уровень экспериментальных исследований. Все выводы диссертации четко обоснованы данными экспериментальной работы и приведенными иллюстрациями, а также корректно сформулированы. Результаты диссертационной работы опубликованы в ведущих зарубежных и российских научных журналах, ее результаты апробированы на международных конференциях. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В целом, в диссертационной работе показаны крайне важные и неизвестные до настоящего момента результаты о роли митохондрий и активных форм кислорода

в нарушении функций митохондрий, а также четко продемонстрировано, что митохондриально-направленные антиоксиданты и разобщители окислительного фосфорилирования могут хотя бы частично блокировать дисфункцию эндотелия, в том числе *in vivo*. Таким образом, диссертационная работа Влады Вячеславовны Захаровой соответствует всем требованиям п.9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. Автор работы, В.В. Захарова, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени.

Результаты работы могут быть использованы в МГУ им. Ломоносова, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Институте биологии гена РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН и других организациях, исследующих редокс-биологии, основ воспаления и ассоциированных с ним патологий.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании коллоквиума Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений ИМБ РАН (протокол от 08 сентября 2016 года).

Ведущий научный сотрудник
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН, к.х.н.



А.В. Иванов

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии
наук
(ИМБ РАН)

119991, ГСП,-1, г.Москва В-334, ул. Вавилова, 32. Для телеграмм: Москва В-334, ИМБ РАН.; л/с 06319001290 в ОФК по
ЮЗАО г.Москвы, т.сч. 40503810300001009007, в Отделении №1 Московского ГТУ Банка России г..Москва 705, БИК
044583001, ИНН. Банка 7724189956 ОКПО – 02699501, ОКОНХ - 95110 тел. 135-23-11. 135-11-60; факс 135-14-05

Сведения о ведущей организации

по кандидатской диссертации Захаровой Влады Вячеславовны «Роль митохондрий в
нарушении барьерной функции эндотелия, вызванном фактором некроза
опухоли», представленной к соисканию ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.03.04 — Клеточная биология, цитология, гистология

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	<i>ИМБ РАН</i>
Ведомственная принадлежность	Федеральное Агентство Научных Организаций
Фамилия, имя, отчество руководителя ведущей организации	Макаров Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН
Фамилия, имя, отчество сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Иванов Александр Владимирович, кандидат химических наук (специальность 03.01.03 – молекулярная биология), старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений
Место нахождения	г. Москва, ул. Вавилова, д.32
Почтовый индекс, адрес организации	119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32
Адрес официального сайта в сети Интернет	www.eimb.ru
Телефон	+74991352311
Адрес электронной почты	isinfo@eimb.ru

Список публикаций сотрудников
ведущей организации по теме
диссертации соискателя в
рецензируемых научных изданиях за
последние 5 лет
(не более 15 публикаций)

1. Smirnova O.A., Ivanova O.N., Bartosch B., Valuev-Elliston V.T., Mukhtarov F., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. Hepatitis C virus NS5A protein triggers oxidative stress by inducing NADPH oxidases 1 and 4 and cytochrome P450 2E1. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, vol. 2016, Article ID 8341937.
2. Brault C., Lévy C., Duponchel S., Michelet M., Sallé A., Pécheur E.-I., Plissonnier M.-L., Parent R., Véricel E., Ivanov A.V., Demir M., Steffen H.-M., Odenthal M., Zoulim F., Bartosch B. Glutathione peroxidase 4 is reversibly induced by HCV to control lipid peroxidation and to increase virion infectivity. *Gut*, 2016, 65(1), 144-154.
3. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Petrushanko I.Yu., Ivanova O.N., Karpenko I.L., Alekseeva E., Sominska I., Makarov A.A., Bartosch B., Kochetkov S.N., Isaguliant M.G. HCV core protein uses multiple mechanisms to induce oxidative stress in human hepatoma Huh7 cells. *Viruses*, 2015, 7(6), 2745-2770.
4. Singh K., Poteryakhina A., Zheltukhin A., Bhatelia K., Prajapati P., Sripada L., Tomar D., Singh R., Singh A.K., Chumakov P.M., Singh R. NLRX1 acts as tumor suppressor by regulating TNF- α induced apoptosis and metabolism in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015, 1853(5), 1073-1086.
5. Isaguliant M., Smirnova O., Ivanov A., Kilpelainen A., Kuzmenko Yu., Petkov S., Latanova A., Krotova O., Engström G., Karpov V., Kochetkov S., Wahren B., Starodubova E. Oxidative stress induced by HIV-1 reverse transcriptase modulates its performance in gene immunization. 2013; *Hum Vaccin Immunother*. 2013; 9(10), 2111 - 2119.
6. Ivanov A.V., Bartosch B., Smirnova O., Isaguliant M.G., Kochetkov S.N. HCV and oxidative stress in the liver. *Viruses*, 2013, 5, №2, 439-469.
7. Smirnova O.A., Isaguliant M.G., Hyvonen M.T., Keinänen T.A., Tunitskaya V.L., Vepsäläinen J., Alhonen L., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. Chemically induced oxidative stress increases polyamine levels by activating the transcription of

ornithine decarboxylase and spermidine/spermine-N1-acetyltransferase in human hepatoma HUH7 cells. Biochimie, 2012, 94(9), 1876-1883.

8. Petrushanko I.Y., Yakushev S., Mitkevich V.A., Kamanina Y.V., Ziganshin R.H., Meng X., Anashkina A.A., Makhro A., Lopina O.D., Gassmann M., Makarov A.A., Bogdanova A. S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic α subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. J. Biol. Chem., 2012, 287(38), 32195-32205.

9. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isaguliants M.G. Hepatitis C Virus Proteins Activate NRF2/ARE Pathway by Distinct ROS-Dependent and Independent Mechanisms in HUH7 cells. PLoS One, 2011, 6(9), e24957

10. Смирнова О.А., Иванов А.В., Иванова О.Н., Валуев-Эллистон В.Т., Кочетков С.Н. Клеточные системы защиты от окислительного стресса и стресса эндоплазматического ретикулума: механизмы регуляции и влияние вируса гепатита С. Молекулярная биология. 2011; 45(1), 127-141.

11. Drutskaya M.S., Efimov G.A., Kruglov A.A., Kuprash D.V., Nedospasov S.A.. Tumor necrosis factor, lymphotoxin and cancer. IUBMB Life. 2010, 62(4), 283-289.

«Верно»

Зам. директора ИМБ РАН,
доктор биологических наук



В.Л. Карпов

« 6 » июля 2016 года