

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора
Иванова Алексея Сергеевича на диссертационную работу
Владимирова Георгия Константиновича

**«Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с
с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.02 - Биофизика

Актуальность темы диссертации.

Апоптоз – процесс, необходимый для поддержания жизнедеятельности тканей на основных этапах развития многоклеточного организма. Установлено, что для запуска апоптоза необходимо образование комплекса цитохрома с с кардиолипином, который обладает пероксидазной активностью. Несмотря на большое количество исследований, до сих пор структура комплекса и химизм катализируемых им реакций являются предметом исследований и дискуссий. Работа Владимирова Г.К. посвящена изучению структурных и функциональных свойств этого белково-липидного комплекса. Одной из целей работы было изучение свойств данного комплекса в гидрофобном окружении, что практически никогда не изучалось. Предполагается, что находясь именно в гидрофобном окружении комплекс цитохрома с с кардиолипином выполняет свою проапоптотическую функцию. Работа в данном направлении представляет интерес не только для фундаментальной науки, но также и для практики, поскольку понимание молекулярного механизма апоптоза позволит в дальнейшем разрабатывать новые лекарственные средства, подавляющие апоптоз в одних случаях или усиливающие его в других, например, для борьбы с онкологическими заболеваниями. Таким образом, актуальность работы определяется своевременностью проведения исследований нового и еще малоизученного объекта для решения важной научно-практической задачи.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные Владимировым Г.К. в работе, основаны на изучении достаточного объема экспериментального материала. В работе использованы современные методы исследования, полностью соответствующие поставленным задачам. Выводы аргументированы и соответствуют проведенным автором исследованиям.

Научная новизна исследования и полученных результатов.

В работе автора проведено систематическое исследование структуры комплекса цитохрома *c* с кардиолипином в гидрофобном окружении и был изучен механизм пероксидазных реакций, катализируемых этим комплексом. Были определены размеры наносфер комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, находящихся в растворенном состоянии, и конформационные свойства цитохрома *c*, находящегося в их составе. Было показано, что в разбавленных водных растворах и в гидрофобном растворителе комплекс цитохрома *c* с кардиолипином катализирует образование липидных радикалов по тому же механизму пероксидазного цикла, по которому работают и классические пероксидазы. Также показано, что при добавлении комплекса цитохрома *c* с кардиолипином к суспензии митохондриальных мембран в присутствии перекиси водорода, могут быть запущены реакции липидной пероксидации.

Научно-практическая значимость исследования.

Полученные результаты позволяют глубже понять свойства комплекса цитохрома *c* с кардиолипином и предположить возможный механизм запуска апоптоза. Полученные знания позволят в дальнейшем разрабатывать новые подходы в создании противораковых средств нового поколения на основе белково-липидных комплексов с пероксидазной активностью, имитирующих комплекс цитохрома *c* с кардиолипином.

Содержание диссертации, ее завершенность, оформление.

Диссертация изложена на 125 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 36 рисунками. Список литературы включает 190 источников, в том числе 37 отечественных и 153 зарубежных.

Раздел «Введение» содержит описание актуальности работы, обоснование цели и поставленных задач для выполнения работы, а также изложение новизны и практической значимости решения проблемы.

В главе «Обзор литературы» отражено современное состояние исследований в данной области и обсуждены все важнейшие вопросы, имеющие отношение к теме данной диссертационной работы, такие как: апоптоз и липидная пероксидация, структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, применение активированной хемилюминесценции для изучения образования свободных радикалов при пероксидации липидов. Глава написана хорошим литературным языком с анализом достаточного количества отечественных и зарубежных литературных источников, что демонстрирует хорошее знание автора данной проблемы.

В главе «Материалы и методы исследования» описаны используемые для решения поставленных задач современные методы спектрофотометрических и спектрофлуориметрических измерений, метод динамического светорассеяния, метод активированной хемилюминесценции и статистический анализ. Следует отметить, что метод динамического светорассеяния был применен автором для исследования белок-липидного комплекса, растворенного в неполярном растворителе, что несомненно имеет новизну, так как данный подход ранее широко не использовался для подобных систем. Используемые в работе спектральные и хемилюминесцентный методы анализа, описанные в этом разделе диссертации, были разработаны на кафедре медицинской биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова, что обеспечивает их оригинальность.

В первом разделе главы «Результаты исследований» представлены данные о строении комплекса цитохрома *c* с кардиолипином (размер комплекса и конформация цитохрома *c*). Следующий раздел посвящен изучению ферментативной активности комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, которая была изучена автором как в водной, так и в неполярной среде, а также в присутствии митохондриальных мембран.

В главе «Обсуждение полученных результатов» представлена интерпретация основных результатов выполненной работы. Автором выполнен сравнительный анализ полученных результатов с имеющимися данными в зарубежной и отечественной литературе. Здесь сформулированы и достаточно подробно и логично обоснованы основные положения работы, например, зависимость размера наносфер цитохрома *c* с кардиолипином от соотношения липид/белок.

Итоги проделанной работы сформулированы в выводах. Они достаточно хорошо обоснованы, вытекают из содержания диссертации, написаны логично и последовательно и полностью соответствуют задачам исследования.

Автореферат и статьи в журналах, рекомендованных ВАК, опубликованные по теме диссертации достаточно полно отражают основные положения диссертации.

Замечания.

Принципиальных серьезных замечаний по работе нет. Но несмотря на высокую общую положительную оценку, имеются некоторые мелкие замечания:

- 1) В обзоре литературы, на мой взгляд, автору следовало большее подробно обсудить работу Kagan (2018) по моделированию структуры комплекса цитохрома с с кардиолипином.
- 2) Также, по-моему, в литературном обзоре уделено недостаточно внимания вопросу об условиях и молекулярном механизме связывания цитохрома с с кардиолипином.
- 3) Редакционные недостатки и опечатки:
 - многие рисунки в диссертации приведены слишком в мелком масштабе, что затрудняет детальное их изучение;
 - в тексте местами отсутствуют ссылки на рисунки;
 - в Табл. 2 на с. 31 вместо указания «фосфатный буфер» и значения pH, указан KH_2PO_4 , что формально неверно, так как фосфатный буфер состоит из смеси двух или даже трех солей фосфата калия разной основности, в зависимости от pH;
 - в работе встречаются отдельные, но досадные опечатки, например, в той же Табл. 2 концентрация фосфатного буфера указана в единицах «Мм»;
 - местами в тексте встречаются стилистические погрешности.

Перечисленные выше замечания не снижают положительной оценки диссертационной работы и не влияют на корректность сформулированных автором выводов.

Заключение.

Учитывая все вышесказанное считаю, что диссертация Владимирова Георгия Константиновича на тему «Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика, является законченной научно-квалификационной работой, которая содержит

новое решение актуальной научной задачи - получение новых знаний о комплексе цитохрома *c* с кардиолипином: данных о его размере, химическом составе, конформации белка в комплексе и о механизме образования им свободных радикалов в гидрофобном окружении, в котором он выполняет свою роль триггера программируемой смерти клеток – апоптоза.

Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г.), а ее автор, Владимиров Георгий Константинович, достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - Биофизика.

Заведующий лабораторией
межмолекулярных взаимодействий
ФГБНУ “Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”,
д.б.н, профессор



Иванов Алексей Сергеевич

26 ноября 2018 г.

ФГБНУ “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
8(499) 246-69-80, 8(499) 246-34-66; inst@ibmc.msk.ru.

Подпись Иванов А.С.
заверяю Карпова Е.А.
Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.

