

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ФГБУН «Институт биохимической физики

им. Н.М. Эмануэля» РАН

д.х.н., профессор

Курочкин И.Н.



Отзыв ведущей организации

**о научно-практической значимости диссертации Владимирова
Георгия Константиновича на тему: «Структура и пероксидазная
функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в
неполярном окружении», представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.**

Актуальность темы выполненной работы.

Известно, что для протекания апоптоза необходимо образование комплекса цитохрома с с кардиолипином, изменение конформации цитохрома с и появление в нем доступного для субстратов активного центра, осуществляющего пероксидацию – гемового железа со свободной валентностью, что и обуславливает проявление цитохромом с пероксидазной активности по отношению к липидам. Знание механизмов этого процесса чрезвычайно важно, как для фундаментальной науки, так и для разработки лекарственных средств, позволяющих корректировать течение многих заболеваний, в основе развития которых лежат нарушения апоптоза.

В связи с вышесказанным актуальность диссертационного исследования Владимирова Георгия Константиновича, целью которого

является исследование физико-химических свойств комплекса цитохрома с с кардиолипином: данных о его размере, химическом составе, конформации белка в комплексе и о механизме образования им свободных радикалов в гидрофобном окружении, не вызывает сомнений.

Связь с планами соответствующих отраслей науки.

Диссертационная работа Г.К. Владимирова выполнена в соответствии с основными направлениями программы научных исследований Факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов.

В работе Г.К. Владимирова впервые было проведено систематическое исследование ранее открытых на кафедре Медицинской биофизики ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова наноструктур (наносфер комплекса цитохрома с с кардиолипином – Цит-КЛ). Были определены размеры этих наносфер и конформационные свойства цитохрома с, находящегося в их составе. Было показано, что как в водных растворах, так и в неполярной среде наносферы Цит-КЛ образуют радикалы липопероксидов по механизму пероксидазного цикла, аналогичному известному циклу реакций у классических растительных и животных пероксидаз. Проведенные в диссертационной работе исследования пероксидазной функции и структуры Цит-КЛ, находящегося в неполярной среде, позволили прояснить роль и механизм биологической функции Цит-КЛ в инициировании программируемой смерти клеток, апоптоза. Было показано, что при добавлении комплекса Цит-КЛ к суспензии и митохондриальных мембран в присутствии перекиси водорода происходит образование липидных радикалов, что может прояснить роль и механизм биологической функции Цит-КЛ в инициировании программируемой смерти клеток. Установлено

также, что при добавлении комплекса Цит-КЛ к суспензии митохондриальных мембран в присутствии перекиси водорода происходит образование липидных радикалов, что может объяснить механизм апоптогенного и цитотоксического действия Цит-КЛ на раковые клетки, обнаруженного в работе, проведенной с участием диссертанта на культурах опухолевых клеток, как не обладающих, так и обладающих лекарственной устойчивостью по отношению к известным противораковым препаратам. Эта работа дает перспективу для разработки противоракового лекарственного препарата нового типа, природной наноструктуры, против которой не действуют защитные внутриклеточные механизмы, приводящие к лекарственной резистентности.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Данная работа, вероятно, изменит направленность теоретических исследований структуры комплекса Цит-КЛ. До сих пор практически все ученые, работавшие в данной области, исходили из предпосылки, что цитохром *c* прикрепляется к поверхности липидного бислоя мембраны и все его реакции (по крайней мере частично) протекают в водной среде. Диссертант привел экспериментальные доказательства, что комплекс цитохрома *c* с кардиолипином представляет собой гидрофобную наносферу, в которой белок находится в состоянии расплавленной глобулы и обладает квази-липоксигеназной и липопероксидазной активностью. Также показано, что обе эти реакции могут протекать в полностью гидрофобном окружении – в неполярном растворителе, в котором, по всей видимости, находится Цит-КЛ и в мембранах митохондрий. Полученные в диссертационной работе данные раскрывают молекулярно-клеточные механизмы апоптогенного и цитотоксического действия Цит-КЛ, что позволяет в ближайшем будущем начать поиск противораковых агентов нового типа – белково-липидных наноструктур, обладающих липопероксидазной активностью.

Личный вклад автора.

Личное участие Г.К. Владимирова заключалось в проведении всех экспериментов, результаты которых представлены в диссертационной работе, кроме экспериментов на раковых клетках. Лично автором были проведены обработка и интерпретации всех полученных данных.

Рекомендации по использованию результатов и выводов.

Теоретические положения, сформулированные в диссертационном исследовании целесообразно использовать в учебном процессе кафедр фундаментальных медицинских наук.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Научные положения и практические рекомендации, сформулированные автором в диссертации, основаны на изучении большого объема экспериментального материала. В работе использованы современные методы исследования и математической статистики, полностью соответствующие поставленным задачам. Выводы аргументированы и вытекают из проведенных автором исследований.

Количество печатных работ.

Основные положения диссертационной работы Г.К. Владимирова отражены в 6 печатных работах, из них – 2 статьи в рецензируемых отечественных журналах, рекомендованных ВАК, 2 статьи в международных журналах, 2 тезисов докладов. Содержание автореферата и печатных работ соответствует материалам диссертации.

Достоинства работы.

Основным достоинством диссертации Г.К. Владимирова является оригинальность подхода к исследованию механизмов

функционирования цитохрома *c* в митохондриальной мембране. А именно: ранее исследователи полагали, что цитохром *c* прикрепляется к мембране и работает в водной среде, диссертант и его руководители впервые обратили внимание на возможность протекания ферментативных реакций в полностью гидрофобном окружении – в неполярном растворителе, в котором, по всей видимости, находится Цит-КЛ и в мембранах митохондрий. Данный подход и убедительные экспериментальные доказательства возможности его осуществления, безусловно, представляют основную ценность данного исследования. К достоинствам работы, вероятно, следует отнести и полученные в ней обоснования для создания нового типа противораковых препаратов на основе комплексов кардиолипина с насыщенными жирными кислотами и цитохрома *c*.

В работе имеются следующие недостатки:

- 1) В обзоре литературы не нашли отражения работы по перекисному окислению липидов в биологических мембранах, выполненные под руководством профессора Бурлаковой Е.Б., а также группы В.Е. Кагана по математическому моделированию структуры комплекса цитохрома *c* с кардиолипином (Mohammadyani, D. et al., Biochim Biophys Acta. Biomembr. (2018) 1860, 1057-1068).
- 2) В главе «Результаты», на наш взгляд, не стоило отдельно выделять раздел *«Изучение механизма цитотоксического действия комплекса Цит-КЛ на раковые клетки»*, так как сам диссертант не проводил экспериментов по действию комплекса **на раковые клетки**, это делали соавторы его работы. Однако в основе объяснения цитотоксического действия комплекса лежат результаты, полученные диссертантом методом хемилюминесценции. Их лучше было бы объединить в разделе *«Образование липопероксильных радикалов в реакциях, катализируемых комплексом Цит-КЛ»*.

3) В опытах с митохондриями не было отдельно изучено взаимодействие комплекса Цит-КЛ с наружной и внутренней мембранами, а изучалось взаимодействие с суспензией, содержащей обе митохондриальные мембраны.

Заключение.

Диссертационная работа Владимирова Георгия Константиновича «Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является законченным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, выполненным под руководством академика РАН, профессора Владимирова Юрия Андреевича, результаты которого имеют существенное значение для современной биофизики.

В исследовании Владимирова Георгия Константиновича решена важная научная задача – охарактеризован комплекс цитохрома с с кардиолипином: получены данные о его размере, химическом составе, конформации белка в комплексе и о механизме образования им свободных радикалов в гидрофобном окружении.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Владимирова Георгия Константиновича 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 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Владимиров Георгий Константинович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Отзыв на диссертацию обсуждён и утвержден на заседании объединённого научного семинара «Физико-химическая биология» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской академии наук (протокол № __5__ от «28» ноября 2018г.).

Главный научный сотрудник
ФГБУН «Институт
биохимической физики им. Н.М.
Эмануэля» РАН,
д.б.н., профессор



/Пальмина Надежда Павловна/

Подпись д.б.н., профессора Пальминой Надежды Павловны заверяю
Ученый секретарь
ФГБУН «Институт биохимической
физики им. Н.М. Эмануэля» РАН,
к.б.н.



/Скалацкая Светлана Ивановна /

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской
академии наук

Адрес: 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Тел.: +7 (499) 137-6420

e-mail: ibcp@sky.chph.ras.ru, golan@sky.chph.ras.ru