

## ОТЗЫВ

на диссертационную работу Степановой Анастасии Евгеньевны  
**«Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и  
искусственных мембран продуктами ω-окисления жирных кислот:  
механизмы и возможная роль в патологии клетки»**, представленную на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности  
1.5.2 – биофизика

Исследование механизмов и особенностей регуляции проницаемости биологических и искусственных мембран является актуальной темой. В частности, предметом изучения целого ряда ведущих исследовательских групп в области биофизики и мембранологии является регуляция проницаемости внутренней мембраны митохондрий различных органов и тканей. Считается, нарушения работы систем транспорта ионов через внутреннюю мембрану этих органелл, а также формирование неспецифических пор лежит в основе развития целого ряда патологий, включая ишемию, диабет, нейродегенеративные заболевания и др. В контексте вышесказанного, особый интерес представляют жирные кислоты, выполняющие важную структурную и функциональную роль в эукариотических клетках. В этерифицированной форме они являются основными компонентами фосфолипидов мембран. Пул, представленный свободными жирными кислотами различной структуры, используется в качестве субстрата окисления и, с другой стороны, оказывает важное влияние на процессы, происходящие в биологических мембранах. В связи с этим, диссертационная работа Анастасии Евгеньевны Степановой, посвященная выяснению механизмов Ca<sup>2+</sup>-зависимого воздействия продуктов ω-окисления пальмитиновой кислоты – ω-гидроксипальмитиновой (ГПК) и ω-гексадекандикарбоновой (ГДК) кислот, на биологические и искусственные мембраны, характеризуется актуальностью и новизной.

Диссертационная работа А.Е. Степановой изложена на 107 страницах машинописного текста и традиционно состоит из введения с описанием цели и поставленных задач исследования, научной новизны, практической значимости, собственного вклада автора работы, подробного обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов и списка используемой литературы. Материалы диссертации апробированы на всероссийских и международных конференциях и съездах и опубликованы в виде 11 печатных работ, из которых 4 опубликованы в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования РФ и соответствующих специальности 1.5.2 – биофизика.

Во введении диссертантом обоснована актуальность изучаемой проблемы, цель и задачи исследования, аргументирована научная новизна работы, ее практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы освещается современное состояние проблемы; его отличает логичное построение и грамотное изложение. Автором продемонстрирована широкая научная эрудиция, глубокое знание проблемы, он подробно описывает фазовое поведение липидов в мембранах. Особое внимание диссертант уделяет описанию механизмов полиморфных фазовых переходов, которые характерны для липидных мембран, содержащих исследуемые жирные кислоты. Автор исчерпывающе подробно описал современное представление феномена перехода проницаемости митохондриальной мембраны, опираясь на самые последние данные зарубежных и отечественных авторов. Важное внимание в обзоре уделено также особому типу проницаемости («пермеабилзации») мембран, обусловленному перестройками липидов мембран, индуцированному свободными жирными кислотами различной структуры и ионами кальция. Учитывая тематику работы, значительный акцент сделан на описание структуры и роли продуктов омега-окисления жирных кислот в клетке, а

также механизмов их влияния на проницаемость липидного бислоя мембран. Следует отметить, что автору не составило большой проблемы найти интересующую литературу – коллектив авторов МарГУ и привлеченные коллеги из ИГЭБ РАН являются признанными лидерами в этой области биофизики. Таким образом, А.Е. Степанова представила критический обзор по данной проблеме и осветила имеющиеся в литературе разные точки зрения на механизмы индукции неспецифической проницаемости липидных мембран.

Экспериментальная часть работы начинается с описания объекта исследования и методов, использованных при выполнении диссертационного исследования. Для достижения поставленных задач, автором применялся широкий круг традиционных и современных биофизических методов и ряд частных методов мембранологии.

В результате проведенного исследования А.Е. Степановой получены экспериментальные данные, позволившие автору показать существование универсального механизма, лежащего в основе кальций-зависимого влияния продуктов  $\omega$ -окисления жирных кислот на биологические и искусственные мембраны, который заключается в агрегации липидных мембран, сопровождающейся нарушением их барьерной функции, что автор описывает термином «пермеабилзация». Показано, что продукты  $\omega$ -окисления пальмитиновой кислоты (ГПК и ГДК) способны индуцировать агрегацию эритроцитов крыс в присутствии ионов кальция. Такой эффект наблюдается и в случае изолированных митохондрий печени, сердца и почек крыс, однако изучаемые жирные кислоты характеризуются различной эффективностью в случае каждого конкретного органа. Выявлено, что чувствительность митохондрий печени крыс к кальций-зависимому эффекту ГДК усиливается с увеличением возраста животных, что, по мнению автора работы, обусловлено дополнительным вкладом окислительного стресса, также влияющего на свойства биологических мембран. Выдвинутое автором предположение о липидной природе поры получило свое дальнейшее

развитие в опытах на модельных мембранных системах – лецитиновых липосомах. Установлено, что ГПК и ГДК в присутствии ионов кальция способны индуцировать агрегацию липосом, которая сопровождается увеличением размера частиц и также приводит к медленному выходу содержимого (флуоресцентного красителя) из липосом. В одной из статей по материалам диссертации показано, что эффективность ГПК и ГДК как индукторов неспецифической проницаемости мембраны липосом существенно уступает эффективности монокарбоновой пальмитиновой кислоты. В то же время в диссертации отмечено, что на митохондриях печени наблюдается противоположная картина: ГДК, аналог пальмитиновой кислоты, превосходит ее по своей эффективности.

В разделе «Закключение» автор подытоживает все полученные результаты, дается цельная картина механизма действия изучаемых жирных кислоты как индукторов кальций-зависимой агрегации и пермеабилзации мембран клеток, митохондрий и липосом. Делаются вполне обоснованные предположения о том, что описанные процессы могут играть роль в индукции клеточной гибели.

В ходе ознакомления с экспериментальной частью работы возникло несколько вопросов и замечаний:

1. Насколько физиологичны используемые Вами в работе концентрации жирных кислот? При каких условиях эти жирные кислоты достигают подобных концентраций в сыворотке крови, а также в цитоплазме разных клеток?
2. В тексте диссертации автор называет эритроциты клетками, однако, правильнее было бы называть их постклеточными структурами, так как эритроциты в ходе эритропоэза на стадии созревания теряют практически все органеллы.
3. Автор оценивал влияние сыворотки на эффективность агрегации эритроцитов, вызванной жирными кислотами и ионами кальция. Показано, что в этих условиях пальмитиновая кислота практически не эффективна, а

ГПК и ГДК продолжают проявлять мембранотропное действие. Автор полагает, что снижение эффекта пальмитиновой кислоты в этих условиях обусловлено ее связыванием с альбуминами и другими белками сыворотки. Оценивал ли автор концентрацию этих белков в сыворотке? Насколько они могут соотноситься с возможным уровнем исследуемых жирных кислот?

4. Автором показано, что жирные кислоты в присутствии кальция индуцируют образование агрегатов эритроцитов в суспензии и снижение числа одиночных клеток. Вероятно, такие клеточные агрегаты могут влиять на гематокрит, а в дальнейшем и на характер тока жидкости крови, так как важнейшим свойством эритроцитов, обуславливающим их способность выполнять транспортные функции в системе сосудов микроциркуляции, является их деформируемость, зависящая от геометрии клетки, ее мембранной вязкоэластичности и цитоплазматической вязкости. Это важный аспект данной работы. К сожалению, он не раскрыт в полной мере.

Следует отметить, что указанные недочеты, высказанные замечания и вопросы не умаляют несомненных достоинств работы и большого экспериментального труда диссертанта.

В работе автора использовала соответствующие поставленным целям и задачам общепринятые экспериментальные биофизические методы, а также адекватные методы статистической обработки полученных данных. Результаты исследования достаточно полно отражены в иллюстративном материале, позволяющем свободно ориентироваться в представленных экспериментальных данных. Обсуждение результатов исследовательской работы проведено с использованием существенного объема библиографических данных. В целом, научные положения диссертации обоснованы и вытекают из собственных данных автора, выводы и рекомендации, сформулированные на их основе, соответствуют представленным материалам.

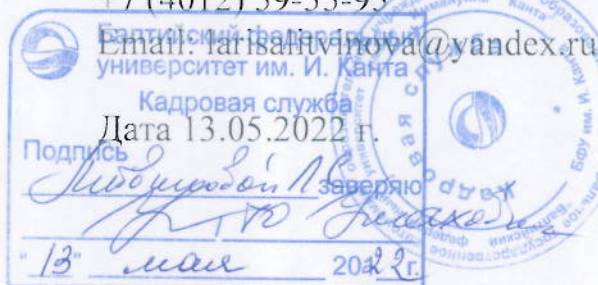
Диссертация Степановой Анастасии Евгеньевны на тему: «Ca<sup>2+</sup>-зависимая агрегация и пермеабилзация биологических и искусственных

мембран продуктами ω-окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика, посвящена актуальной теме. В ней полностью, на современном научно-методическом уровне, решены поставленные задачи. Автореферат и опубликованные работы отражают содержание диссертации.

Таким образом, диссертация Степановой А.Е. является законченной научно-квалифицированной работой, в которой содержится решение одной из приоритетных задач биофизики и мембранологии. Считаю, что диссертационная работа А.Е. Степановой удовлетворяет всем требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., №842 (с изменениями, внесенными постановлением Правительства Российской Федерации от 11.09.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Степанова Анастасия Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 –биофизика.

### Официальный оппонент

директор центра иммунологии и клеточных биотехнологий,  
профессор кафедры фундаментальной  
медицины медицинского института  
Федерального государственного  
автономного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Балтийский федеральный университет  
имени Иммануила Канта»,  
доктор медицинских наук,  
(14.00.16 - патологическая физиология,  
03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология).  
236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14,  
+7 (4012) 59-55-95



Лариса Сергеевна Литвинова