

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Ри Натальи Александровны на тему: «Анализ молекулярных механизмов утилизации нитрита в клетке *Escherichia coli* методами математического моделирования», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Актуальность избранной темы. В настоящее время, несмотря на накопленный большой объем экспериментальных данных и проведенных теоретических исследований, а также взрывное развитие технологий, математическое моделирование остается важным, а в некоторых случаях — единственным, инструментом исследования молекулярных механизмов. Точность такого инструмента оттачивается с каждым успешным применением.

Ярким примером такого грамотного использования математического моделирования служит данная работа. Автор исследует важную, но мало изученную, динамику функционирования тесно связанных генетических систем нитрит-ассоциированной цепи передачи электронов и нитритного метаболизма в клетке *E. coli*. Система анаэробного дыхания у бактерии *E. coli* на нитрите представляет интерес в первую очередь потому, что этот тип дыхания наиболее характерен для бактерии в среде ее естественного обитания в кишечнике животных и человека. Важными факторами выбора данной системы дыхания являются возможность поступления нитрата с пищей и его свойство сильнейшего акцептора в цепи передачи электронов. С другой стороны, метаболиты, образующиеся в процессе утилизации нитрата, и нитрит токсичны для клеток бактерии и хозяина. Было также показано, что изучаемые механизмы контроля утилизации нитрита в нетоксичные продукты могут быть важны при ликвидации последствий заболеваний. Применяемый в работе метод математического моделирования призван помочь вскрыть неизвестные механизмы исследуемого процесса.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. К наиболее важным научным

результатам исследования, характеризующим его новизну, могут быть отнесены:

- Впервые разработана математическая модель утилизации нитрита клетками *E. coli*, учитывающая молекулярно-генетические механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы периплазматической и цитоплазматической нитритредуктаз и транспортного белка NirC.
- Свойства модели позволили исследовать вклад различных компонентов системы в кинетику утилизации нитрита в условиях стационарного роста культуры клеток и показать, что учет рассмотренных молекулярно-генетических механизмов не позволяет описать экспериментально наблюдаемую кинетику утилизации нитрита в области низких концентраций в среде (ниже 2 мМ) без дополнительных предположений.
- Сформулирована гипотеза о формировании дополнительной нитрит-утилизующей активности в области концентраций нитрита в среде менее 1 мМ за счет локального изменения концентрации периплазматической Nrf нитритредуктазы при переходе из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала, возникающего благодаря активности ферментов респираторной цепи.
- Математическим моделированием показана достаточность мембранного потенциала как механизма регуляции активности респираторной периплазматической Nrf редуктазы для корректного описания кинетики утилизации нитрита в хемостате.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Теоретическая значимость исследования состоит в том, что:

- впервые путем анализа динамики функционирования респираторной системы анаэробного дыхания на нитрите в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста клеток *E. coli* выявлен новый механизм регуляции нитрит-утилизующей активности при концентрациях субстрата, характерных для естественных мест обитания энтеробактерий, связанный с действием мембранного потенциала.
- механизм действия мембранного потенциала в теоретических исследованиях оказался не зависим от сценария его формирования. Результаты моделирования

дополняют имеющиеся представления о респираторной системе *E. coli*, использующей в качестве субстрата токсичные для клетки вещества, каковым является нитрит, и могут послужить основой для дальнейших экспериментальных исследований системы утилизации нитрита у *E. coli*.

Практическая значимость исследования заключается в том, что разработанные в ходе проведения исследований математические модели подробно описаны в свободно доступных публикациях, и, следовательно, могут быть использованы другими исследователями.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Работа Ри Н.А. построена по общепринятой схеме и состоит из введения, обзора литературы, двух глав, описывающих материалы, методы, результаты собственных исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает в себя 237 источников, из них только 11 на русском языке, остальные 226 на английском языке, что говорит о хорошем владении автором зарубежной литературой. Из общего числа 34 источника или примерно 14% относятся к последним 5 годам (2014-2018 гг.). Работа изложена на 155 страницах и содержит 8 таблиц и 27 рисунков.

Структура и логика изложения соответствуют поставленным в диссертации задачам исследования, нацеленным на изучение механизма в целом и исследование вклада отдельных компонентов системы:

1. Разработать модель утилизации нитрита клетками *E. coli* в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста культуры в проточном хемостате и адаптировать ее к экспериментальным данным по динамике экспрессии генов *nrfA*, *nirB* и *nirC*, кодирующих белки, входящие в состав ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит.
2. Исследовать вклад Nrf и NirB нитритредуктаз и транспортного белка NirC в кинетику утилизации нитрита культурой клеток *E. coli* в проточном хемостате.
3. Реконструировать структуру респираторной цепи в условиях дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате и разработать структурную модель формирования цепи передачи электронов от донора к акцептору.

4. Исследовать динамику функционирования модели утилизации нитрита, дополненную молекулярно-генетическими механизмами формирования протонного градиента, в условиях анаэробного дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате.

5. Исследовать вклад мембранного потенциала в регуляцию активности респираторной Nrf нитритредуктазы в условиях стационарного роста и дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате.

Для решения поставленных задач автор опирается на обширную теоретическую и методологическую базу. Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, охарактеризованы научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования, сформулированы два положения, выносимые на защиту, содержащие наиболее существенные результаты работы, обладающие научной новизной.

Обзор литературы (стр. 13) очень подробен и обстоятелен, охватывает как описание биологических процессов, протекающих в респираторной системе в условиях анаэробного дыхания (стр. 13-43), так и различные подходы к математическому моделированию таких процессов, а также существующие модели респираторных систем у прокариот и эукариот (стр. 43-51). Приводится собственное заключение (стр. 52).

В Главе 2 (стр. 53) описана разработка модели утилизации нитрита культурой клеток *E. coli*, культивируемой в глюкозо-лимитированных условиях хемостата. Два варианта модели — базовый (стр. 55) и расширенный (стр. 78) — были разработаны и адаптированы к экспериментальным данным по динамике экспрессии генов *nrfA*, *nirB*. В отличие от модели M1, в которой концентрации белковых комплексов рассматриваются в стационаре, в модели M2 процессы формирования белковых комплексов, ферментативные реакции, транспорт из цитоплазмы в периплазму, деградация белков и их комплексов описаны биохимическими неравновесными реакциями. Модель состоит из 11 подсистем с использованием обобщенных функций Хилла, которые собраны в итоговую модель на основе суммирования локальных скоростей элементарных процессов.

Для подтверждения выдвинутой гипотезы об участии мембранного потенциала в регуляции активности Nrf нитритредуктазы в Главе 3 (стр. 102) реконструиро-

ваны молекулярно-генетические механизмы его формирования в условиях дыхания на нитрите (стр. 103-109). Проведено исследование вклада мембранного потенциала в кинетику утилизации нитрита в хемостате. Значение мембранного потенциала в математической модели М3 (стр. 110) и М4 (стр. 117) определялось не феноменологической функцией, а введено через соотношение концентраций протонов в периплазме и цитоплазме.

В заключении диссертационной работы (стр. 129) кратко обобщены основные результаты исследования. По результатам работы сформулированы обоснованные выводы (стр. 132).

Таким образом, на основе достаточного анализа предметной области, адекватной постановки научной проблемы и задач исследования, корректного применения современных подходов и методов получены вполне достоверные и обоснованные результаты.

Замечания по содержанию и оформлению диссертации.

Стр. 46, 1.5.2. Динамические модели. Автору стоило принять во внимание, что в таких моделях уравнения могут быть не только обыкновенными дифференциальными, но и дифференциально-разностными и в частных производных. Модели, использующие клеточные автоматы, и стохастические модели также описывают системы в динамике.

Стр. 60, формула 2.6. Автору стоило указать как было получено это выражение - в ручную или в системе Математика.

Стр. 54 формула СКО. Автор не пояснил, почему была выбрана именно такая мера точности, ошибочно называемая «среднеквадратичным отклонением». По приведенной формуле рассчитывается сумма квадратов отклонений.

На стр. 64, стр. 92, таб. 5 и стр. 123-126 таб. 6-8 приводятся параметры, подобранные так, чтобы приблизить модель к данным. Автор должен был пояснить какой использовался метод, сколько было получено наборов параметров, каков был разброс в этих наборах, использовались ли потом какие-

то конкретные наборы или средние значения, какова устойчивость модели к изменению параметров.

На стр. 69 автор должен был объяснить откуда появляется значение 0.28 мМ/сек. На рис. 15 красная кривая проходит выше значения 0.3. Стр. 74, рис. 18, а-г, кривая 3. На рис 18 нет букв, нет номеров кривых, непонятно как соотносятся различные уровни фермента 16%, 45%, 67% и 86% с кривыми. Возможно в подписи это дано через значения дельт, но там имеются ссылки на а-г, которых нет и все равно непонятно что где. Отсылка на рис 14 непонятна тоже, автору следовало пояснить какую кривую надо сравнивать и как.

Стр. 84. Автору стоило пояснить почему в качестве простейшего вида потенциала U не стали брать кусочно-линейную функцию.

Стр. 126 и раньше тоже. Автору следовало бы сравнивать модели с помощью соответствующих критериев, например, Акайке, так как число параметров в моделях различно и, следовательно, сравнение моделей по СКО некорректно.

Также замечены опечатки:

Стр. 20 — цитохром

Стр. 73 — нараотке → наработке

Отмеченные недостатки, впрочем, не являются критическими, не умаляют ценности работы и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Н.А. Ри.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. Диссертационное исследование Н.А. Ри выполнено на актуальную тему, представляет собой законченную научную работу, имеет теоретическую и практическую ценность.

Основные результаты диссертации изложены в 13 научных работах, из них пять в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК и восемь работ в сборниках тезисов конференций, апробированы научной общественностью и получили положительную оценку.

Автореферат и публикации соискателя отражают основное содержание диссертации.

Таким образом, диссертация Ри Натальи Александровны является научно-квалификационной работой, характеризуется новизной, содержит решение актуальной задачи, имеющей теоретическое и практическое значение, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Ведущий научный сотрудник
НИЛ «Математическая биология и биоинформатика», ИПММ, федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», кандидат биологических наук



Козлов Константин Николаевич
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 29, кор. НИК (АФ), пом. А.3.28,
Телефон: +7-812-290-9642, +7-904-518-8581
Адрес электронной почты: kozlov_kn@spbstu.ru
Место и адрес работы: НИЛ «Математическая биология и биоинформатика» ИПММ ФГАОУ ВО «СПбПУ»
Должность: в.н.с. НИЛ «Математическая биология и биоинформатика» ИПММ