

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_

Решение диссертационного совета от «23» июня 2016 г. № 9 о присуждении Рогову Антону Геннадьевичу, гражданство Российская Федерация, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Взаимосвязь между окислительным стрессом, дисфункцией митохондрий, их фрагментацией и апоптозом в клетках дрожжей» по специальности 03.01.04 Биохимия принята к защите 21 апреля 2016 года (протокол № 6) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013г. №74/нк и от 10.02.2014г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Рогов Антон Геннадьевич, 1988 года рождения, в 2010 г. окончил Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «биоинженерия и биоинформатика». В ноябре 2010 г. Рогов Антон Геннадьевич поступил в очную аспирантуру Учреждения Российской академии наук Института биохимии им. А.Н.Баха РАН, где проходил обучение по ноябрь 2013 г. С ноября 2013 г. работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии им. А.Н.Баха Российской академии наук в должности младшего научного сотрудника, и с июля 2015 г. продолжил работу в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертационную работу Рогов А.Г. выполнял в лаборатории биоэнергетики

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель – Звягильская Рената Александровна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», главный научный сотрудник лаборатории биоэнергетики.

Официальные оппоненты:

Миронова Галина Дмитриевна, заслуженный деятель наук РФ, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, заведующая лабораторией митохондриального транспорта;

Ягужинский Лев Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, заведующий лабораторией структуры и функций мембран

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук в своём положительном заключении, подписанном заведующей лабораторией регуляции биохимических процессов, доктором биологических наук Кулаковской Татьяной Валентиновной, указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью и соответствует критериям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013), а ее автор, Рогов А.Г., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что заслуженный деятель наук РФ, доктор биологических наук, профессор Миронова Галина Дмитриевна является признанным специалистом в области изучения структуры и функций митохондрий; доктор биологических наук, профессор Ягужинский Лев Сергеевич является известным специалистом в области биоэнергетики. Выбор ведущей организации обоснован активно

ведущимися исследованиями в области биохимии, физиологии и генетики дрожжей, включая изучение влияния факторов стресса на жизнедеятельность дрожжевых клеток, а также наличием высококвалифицированных специалистов, проводящих исследования в данной области.

Соискатель имеет 17 опубликованных работ, в том числе 9 статей в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Суханова Е.И., Рогов А.Г., Северин Ф.Ф., Звягильская Р.А. (2012) Феноптоз у дрожжей. Обзор. Биохимия, 77(7), 915-931.
2. Черняк Б.В., Антоненко Ю.Н., Галимов Е.Р., Домнина Л.В., Дугина В.Б., Звягильская Р.А., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Лямзаев К.Г., Пустовидко А.В., Рокицкая Т.И., Рогов А.Г., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев М.В., Ташлицкий В.Н., Титова Е. В., Тренделева Т.А., Шагиева Г.С. (2012) Новые митохондриально-направленные соединения, построенные из природных веществ: конъюгаты растительных алкалоидов берберина и пальматина с пластохиноном. Биохимия, 77(9), 1186-1200.
3. Тренделева Т.А., Рогов А.Г., Черепанов Д., Суханова Е.И., Ильясова Т.М., Северина И.И., Звягильская Р.А. (2012) Взаимодействие тетрафенилфосфония и додецилтрифенилфосфония с липидными мембранами и митохондриями. Биохимия, 77(9), 1230-1239.
4. Trendeleva T.A., Sukhanova E.I., Rogov A.G., Zvyagilskaya R.A., Seveina I.I., Ilyasova T.M., Cherepanov D.A., Skulachev V.P. (2013) Role of charge screening and delocalization for lipophilic cation permeability of model and mitochondrial membranes. Mitochondrion, 13(5), 500-506.
5. Litvinchuk A.V., Sokolov S.S., Rogov A.G., Knorre D.A., Severin F.F. (2013) Mitochondrially-encoded protein Var1 promotes the loss of respiratory function in yeast *Saccharomyces cerevisiae* under stressful conditions. Eur. J. Cell Biol., 92 (4), 169-174.
6. Pustovidko A.V., Rokitskaya T.I., Severina I.I., Simonyan R.A., Trendeleva T.A., Lyamzaev K.G., Antonenko Y.N., Rogov A.G., Zvyagilskaya R.A., Skulachev V.P., Chernyak B.V. (2013) Derivatives of the cationic plant alkaloids berberine and palmatine amplify protonophorous activity of fatty acids in model membranes and mitochondria. Mitochondrion., 13(5), 520-525.
7. Severina I.I., Severin F.F., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V., Ilyasova T.M., Simonyan

R.A., Rogov A.G., Trendeleva T.A., Zvyagilskaya R.A., Dugina V.B., Domnina L.V., Fetisova E.K., Lyamzaev K.G., Vyssokikh M.Y., Chernyak B.V., Skulachev M.V., Skulachev V.P., Sadovnichii V.A. (2013) In search of novel highly active mitochondria-targeted antioxidants: thymoquinone and its cationic derivatives. FEBS Lett., 587(13), 2018-2024.

8. Рогов А.Г., Суханова Е.И., Уральская Л.А., Аливердиева Д.А., Звягильская Р.А. (2014) Альтернативная оксидаза: распространение, индукция, свойства, структура, регуляция, функции (обзор). Успехи биол. химии, 54, 413-456.

9. Рогов А.Г., Звягильская Р.А. (2015) Физиологическая роль митохондриальной альтернативной оксидазы (от дрожжей до растений (обзор). Биохимия, 80(4), 472-479.

Результаты работы были также представлены на 5 международных и 3 Всероссийских конференциях.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведённые в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Мироновой Г.Д. (положительный).**

Отзыв содержит следующие замечания:

«Раздел «Результаты и обсуждение» информативен, хорошо проиллюстрирован рисунками и таблицами. Однако, я сторонник разделять эти два раздела, так как в разделе «Обсуждение результатов» диссертанты обычно сводят результаты проведенных исследований в общую картину с обсуждением своих и анализа литературных данных сходного направления, а также показа, что нового в данном вопросе они сделали. Одной с небольшим страницы «Заключения» представленного автором в данной работе, по моему зрению недостаточно.

В первом разделе «Результатов и обсуждений» диссертантом приведены данные большого количества исследований по действию четырёх известных прооксидантов на различные биоэнергетические параметры митохондрии печени крыс. Все эти вещества создают окислительный стресс в митохондриях, однако, как показано в работе, их влияние на митохондрии различно. Хотелось бы услышать мнение автора, влияние какого из этих факторов на митохондрии ближе к тому, что наблюдается в митохондриях печени животных при создании у них *in vivo* состояния гипоксии. Кроме того, автор использует повышенные концентрации субстратов (20 мМ против 3-5мМ, используемых

обычно работе с митохондриями животных). Ведь известно, что  $K_m$  для сукцината равна 0.3 мМ, а его концентрация в тканях не превышает 1 мМ. Вероятно, сказался опыт работы диссертанта с митохондриями дрожжей, которые менее энергизованы и требуют для своей работы большие концентрации субстрата.

Следующий большой раздел работы касается исследования на созданных моделях веществ, которые могут предотвратить или снизить последствия окислительного стресса. Использовались известные протониферы, и так называемые ионы Скулачёва. Кстати, когда говорится о механизме действия протониферов на снижение образования перекисей, нужно было сослаться на оригинальную работу Коршунова в “Биохимии”, где впервые показан механизм этого действия.

Наиболее перспективным для использования в качестве разобщителя, снижающего образование в митохондриях концентрацию пероксида в медицинских целях является, по мнению автора, разобщитель нового поколения SkQT1. Он, являясь разобщителем, обладает минимумом побочных эффектов на энергетику митохондрий. Автором установлено, что он снижает уровень АФК в клетках дрожжей и предотвращает гибель клеток. По этой части работы у меня возник вопрос, как быстро этот катион выводится из организма, что очень важно для его использования в медицинских целях.

В этой части работы автором получены интересные данные о влиянии ингибитора деления клеток на фрагментацию митохондрий, из которых он делает заключение, что фрагментация митохондрий может рассматриваться как один из механизмов защиты клеток от окислительного стресса. Это очень важный вывод, но я бы посоветовала ему в дальнейшей работе при создании гипоксии использовать электронную микроскопию клеток, так как там происходит, вероятно, не фрагментация, а деление клеток».

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Ягужинского Л.С. (положительный).**

Отзыв содержит следующие замечания:

- «1) Теоретическая часть стоит несколько особняком и мне кажется, что конкретное описание значимости альтернативной оксидазы при апоптозе дрожжей безусловно могло сделать работу более цельной.
- 2) Очень запутанным является рассуждение о разобщающей активности родамина C<sub>4</sub>R1, который представлен в работе то как разобщитель, то как детергент,

сбрасывающий потенциал (рис. 10, 11), иногда он рассматривается как фактор, который открывает неспецифичную пору (РТР) в митохондриях, или описан как переносчик жирных кислот. В то же время автору совершенно очевидно, что положительно заряженный протонофор-разобщитель теоретически не может существовать, поскольку положительный заряд в молекуле делает невозможным осуществлять полный цикл переносчика протонов. Именно это автору и следовало бы указать в самом начале обсуждения проблемы, а потом рассмотреть возможные варианты объяснения полученных данных».

**Отзыв Ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (положительный).**

Отзыв содержит следующие замечания:

«К числу недостатков работы следует отнести оформление таблицы 6.1. на английском языке. Также было бы лучше представить рисунки 7.2-7.4 в большем размере, например, так, как это сделано на рис 7.1, с тем, чтобы наблюдаемые изменения в структуре митохондрий были представлены более наглядно».

**На автореферат поступили положительные отзывы от:**

- научного сотрудника Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, кандидата биологических наук Галкина И.И.;

- ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, доктора биологических наук, профессора Плотникова Е.Ю.;

- главного научного сотрудника кафедры иммунологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» доктора биологических наук Самуилова В.Д. и старшего научного сотрудника кафедры иммунологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» кандидата биологических наук Киселевского Д.Б.;

- старшего научного сотрудника кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» кандидата химических наук Сумбатьян Н.В.;

- главного научного сотрудника лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного учреждения науки «НИИ обще патологии и патофизиологии» доктора биологических наук Сурина А.М.

- заведующего лабораторией аэробного метаболизма микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук доктора биологических наук Моргунова И.Г.;

- заведующего лабораторией дыхания растений и механизмов его регуляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук доктора биологических наук Шугаева А.Г.;

- руководителя группы авторегуляции микробных процессов лаборатории выживаемости микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» доктора биологических наук, профессора Эль-Регистан Г.И. В отзыве приведены следующие замечания:

«В работе хотелось бы видеть более крупные и детальные флуоресцентные фотографии, демонстрирующие развитие фрагментации митохондрий в дрожжах и подавление этого процесса антиоксидантами, но данное замечание имеет рекомендательный характер и не влияет на общую высокую оценку проделанной работы».

**В дискуссии приняли участие 2 человека:**

Доктор биологических наук, профессор А.С. Капрельянц;

Доктор биологических наук, член-корреспондент РАН М.Д. Тер-Аванесян.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты:**

- С<sub>4</sub>R1 является наиболее эффективным из всех до сих пор исследованных катионных разобщителей, но при этом он ингибирует дыхание, промотирует открытие

mPTP, ингибирует синтез, и гидролиз АТФ.

- Бензалконий хлорид в низких концентрациях снижает мембранный потенциал митохондрий печени крыс, промотирует открытие mPTP, ингибирует синтез и гидролиз АТФ, стимулирует продукцию пероксида водорода митохондриями, вызывает окислительный стресс в дрожжевых клетках.
- Митохондриально-направленные антиоксиданты SkQT1 и SkQ1 являются «мягкими» разобщителями окислительного фосфорилирования, они подавляют продукцию пероксида водорода митохондриями печени крысы, не ингибируют гидролиз АТФ и снижают синтез АТФ в соответствии со своим деполаризующим действием.
- Построена модель пространственной структуры дрожжевой альтернативной оксидазы. Найдены и описаны активные центры белка.
- Окислительный стресс вызывал фрагментацию митохондрий в клетках дрожжей *D. magnusii*, которая обращалась и предотвращалась митохондриально-направленными антиоксидантами SkQT1 и SkQ1.
- Окислительный стресс вызывал в клетках дрожжей апоптоз, который частично обращался митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

Исследовано действие бутилового эфира родамина 19 (C<sub>4</sub>R1), бензалкония хлорида (БХ) и SkQT1 на прочносопряженные митохондрии печени крысы. Показано, что C<sub>4</sub>R1 и БХ являются активаторами Ca<sup>2+</sup>/Pn-неспецифической поры и специфическими ингибиторами синтеза и гидролиза АТФ митохондриями (для БХ показано впервые). SkQT1 является наиболее эффективным митохондриально-направленным мембранотропным антиоксидантом нового поколения. Впервые смоделирована пространственная структура альтернативной оксидазы (АО) дрожжей, выявлены ее консервативные участки и активные центры. Показана связь окислительного стресса с фрагментацией митохондрий дрожжей *D. magnusii*, и впервые показана способность митохондриально-направленных антиоксидантов не только предотвращать, но и обращать фрагментацию митохондрий дрожжей, вызванную окислительным стрессом. Данные, полученные в работе, расширяют представления о влиянии окислительного стресса на индукцию апоптоза у дрожжей.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики**

подтверждается тем, что:



- Построенная впервые модель альтернативной оксидазы дрожжей, по-видимому, адекватно описывает структуру и свойства альтернативных оксидаз из других грибов, она полезна при разработке специфических фармацевтических средств лечения микозов.
- Полученные данные должны учитываться при использовании C<sub>4</sub>R1 в качестве потенциального препарата медицинского назначения, необходим баланс между его хорошей способностью проникать в ткани и преодолевать гематоэнцефалический барьер, с одной стороны, а с другой, как было показано, возможным негативным действием на биоэнергетику.
- Выявленное негативное действие на биоэнергетику митохондрий бензалкония хлорида (БХ), широко используемого консерванта для всех типов глазных капель, делает целесообразным замену его менее токсичным консервантом.
- Обнаруженная высокая эффективность (при минимальном побочном действии) нового митохондриально-направленного антиоксиданта SkQT1 позволяет рекомендовать его в качестве перспективного агента при лечении патологий, связанных с дисфункциями митохондрий, вызванными окислительным стрессом.

**Оценка достоверности результатов исследования** выявила, что:

- используемые методики исследования и проведённые расчёты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений, результаты получены на современном оборудовании и хорошо воспроизводимы;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы, отражают наиболее значимые результаты работы и полностью подтверждены экспериментальными данными.

**Личный вклад соискателя** состоит в:

- получении всех экспериментальных данных либо соискателем самостоятельно, либо при его непосредственном участии;
- обработке и интерпретации экспериментальных данных;
- участии в апробации результатов исследования;
- подготовке публикаций по выполненной работе.

Диссертация Рогова А.Г. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов и взаимосвязанностью выводов и результатов.

На заседании «23» июня 2016 года диссертационный совет принял решение

присудить Рогову Антону Геннадьевичу учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 12 докторов биологических наук, 5 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

«за» - 18 , «против» - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя диссертационного  
совета ФИЦ биотехнологии РАН  
доктор биологических наук, профессор



*М.С. Крицкий*  
М.С. Крицкий

Ученый секретарь диссертационного совета  
ФИЦ биотехнологии РАН  
кандидат биологических наук

*А.Ф. Орловский*  
А.Ф. Орловский

«23» июня 2016 г.