

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ  
ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ  
им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук

127276, Москва, И-276, Ботаническая ул., 35  
Тел. (499) 678-54-00, Факс (499) 678-54-20  
E-mail: ifr@ippras.ru

17.05.2023 № 154/23

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_.2023

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева РАН  
чл.-корр. РАН Лось Д.А.

«17 мая 2023 г.



## ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Голевой Татьяны Николаевны «Дисфункция и фрагментация митохондрий, митофагия и гибель клеток дрожжей» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Диссертационная работа Т.Н. Голевой посвящена выяснению влияния новых митохондриально-направленных антиоксидантов и прооксидантов на выделенные митохондрии печени крысы и клетки дрожжей *Yarrowia lipolytica* и *Dipodascus magnusii*, а также изучению взаимосвязи между развитием окислительного стресса с фрагментацией митохондрий и гибелю клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

**Актуальность темы.** Известно, что митохондрии являются основным источником активных форм кислорода (АФК) и вместе с тем одной из наиболее чувствительных мишеней для АФК. В литературе накапливается все больше данных о том, что дисфункция митохондрий под влиянием различных внешних и внутренних факторов приводит к повышению образования АФК, возникновению окислительного стресса (ОС), что, в свою очередь, играет важную роль в возникновении многих заболеваний человека, включая диабет, атеросклероз, рак, сосудистые и нейродегенеративные болезни. Поэтому весьма актуальными представляются подходы

к лечению указанных заболеваний с использованием антиоксидантов, а в случае онкологических болезней и прооксидантов, тем более, если в качестве таких веществ выступают митохондриально-направленные липофильные катионы, так называемые «Скулачев ионы» (SkQ), доставляющие лекарство непосредственно к его мишениям – митохондриям. Вместе с тем, очевидна и необходимость проведения тщательных предварительных доклинических исследований действия таких веществ, особенно вновь синтезированных (антиоксиданта SkQThy и прооксиданта SkQN), на функционирование митохондрий в условиях *in vitro*, а также на структуру митохондрий и биоэнергетику клетки в условиях *in vivo*.

Показано, что, если окислительные повреждения приводят к необратимым повреждениям структуры и функции митохондрий, это может стать отправной точкой в реализации программируемой смерти клеток (ПКС) у животных, растений и дрожжей. Поэтому в клетках всех этих организмов выработан механизм позволяющий удалять необратимо поврежденные или не нужные в данный момент митохондрии – митофагия, которая является селективной формой более общего процесса ПКС – аутофагии. В настоящее время митофагия активно исследуется на животных моделях, поскольку нарушение этого процесса приводит к различным заболеваниям. Несмотря на успехи, достигнутые в изучении митофагии, в том числе у дрожжей, до сих пор многие стороны этого процесса остаются неясными. В частности, предстоит выяснить взаимосвязь между ОС, фрагментацией митохондрий, митофагией и гибелю клеток. В этой связи хорошей моделью для изучения индукции и регуляции митофагии являются клетки дрожжей. Поэтому проведенное в данной работе исследование процессов ОС-индуцированных процессов фрагментации митохондрий, митофагии и ПКС в клетках дрожжей с использованием различных методических подходов, от использования митохондриально-направленных антиоксидантов и прооксидантов, до мутантов с делециями генов, кодирующих белки-регуляторы митофагии, несомненно представляется актуальным и важным не только в теоретическом, но и в практическом плане, для лучшего понимания данных процессов в высших организмах при различных заболеваниях.

**Новизна полученных результатов.** В работе изучены свойства новых митохондриально-направленных «Скулачев ионов», а именно, антиоксиданта SkQThy и прооксиданта SkQN на митохондрии животных (печени крысы) и клетки дрожжей. Было показано, что антиоксидант SkQThy, в отличие от ранее синтезированного SkQ1,

является более эффективным антиоксидантом. Он сохранял свои антиоксидантные свойства в более широком интервале концентраций (от 0.5 до 7.5 мкМ), не проявлял прокислительную активность при увеличении концентрации, а также был способен предотвращать в более низких концентрациях, чем SkQ1 возникновение ОС и гибель дрожжевых клеток, индуцируемую *терт*-бутилпероксидом (*t*-BHP - известным прооксидантом). Кроме того, на дрожжевых клетках впервые изучено развитие и последствия ОС вызванного *t*-BHP и было показано, что ОС возникал вначале в митохондриях, а затем распространялся на весь объем клетки, что сопровождалось фрагментацией митохондрий. При этом SkQThy был способен предотвращать и даже обращать фрагментацию митохондрий и, по-видимому, может быть использован для лечения патологий, связанных с окислительным стрессом.

### **Структура и содержание диссертации.**

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы (включающего 3 главы), материалов и методов исследования, описания результатов исследования и обсуждения (включающего 5 глав), заключения, выводов и списка литературы, включающего 150 источников. Объем работы 102 страницы, иллюстративный материал состоит из 43 рисунков.

В главе 1 обзора литературы рассматривается история и современное состояние проблемы окислительного стресса (ОС) и роли активных форм кислорода (АФК) в жизни клетки. Отмечается важная роль митохондрий в генерации АФК, а также значимости для клетки и организма в целом повреждений митохондрий в результате избыточной генерации и накопления АФК в этих органеллах. Отмечается, что окислительные повреждения могут затрагивать практически все структуры митохондрий от комплексов ЭТЦ до мембран и ДНК, что часто приводит к нарушению функционирования (дисфункции) органелл. В свою очередь митохондриальная дисфункция и редокс-дисбаланс способствуют развитию широкого и все увеличивающегося в настоящее время круга патологий, называемых свободнорадикальными заболеваниями. В обзоре автор рассматривает попытки использовать антиоксиданты для предотвращения последствий ОС, например, в предотвращении процесса старения и возрастных заболеваний (инфаркты, инсульты, некоторые формы рака). Подробно описаны преимущества, которые может дать в профилактике и лечении таких заболеваний использование митохондриально-направленных антиоксидантов или, для раковых клеток, прооксидантов.

Следующие две главы литобзора посвящены в основном описанию белков, участвующих в процессах слияния и фрагментации митохондрий, а также в процессе митофагии. Обе главы написаны кратко, но четко, что говорит о хорошем знании автором современной литературы и умению выбирать наиболее важные и характерные стороны описываемых процессов, а также отмечать их специфику у дрожжей, являющихся лидерами в изучении митофагии, по сравнению, например, с растениями. В качестве небольшого замечания к этой части работы следует отметить отсутствие специального раздела, посвященного процессу гибели клеток, который имеет свою специфику у дрожжей, хотя частично эти сведения приведены в обсуждении полученных результатов.

Несомненно, одним из условий, способствующих успешному выполнению данной работы, был выбор удачных объектов (или моделей) исследования, а также использование целого арсенала современных методов их изучения. Например, для изучения динамики митохондрий были использованы дрожжи *D. magnusii*, гигантские клетки которых были удобны для визуализации митохондрий с помощью современных методов флуоресцентной микроскопии. При изучении процессов фрагментации митохондрий и митофагии более пригодны оказались дрожжи *S. cerevisiae*, благодаря наличию у них многих мутантов с делециями генов отвечающих за деление органелл и генов, участвующих в образовании фагофора и фагосомы. В целом следует отметить, что использованные диссертантом методы соответствовали поставленным задачам и способствовали их успешному решению.

В разделе «Результаты и их обсуждение» изложены результаты проведенных экспериментов и их анализ с учетом имеющихся литературных данных. В главе 1 этого раздела озаглавленной «Дрожжевые модели для исследования динамики митохондрий» объясняются причины выбора дрожжей *D. magnusii* для проведенных исследований. Возможно, часть этой главы можно было бы перенести в методику. Далее приведены интересные результаты, показывающие в реальном времени фрагментацию митохондриального ретикулума в клеке *D. magnusii*, под влиянием прооксиданта *t*-BHP для чего была использована Time lapse - микроскопия с покадровой съемкой. Морфологию митохондрий выявляли с помощью флуоресцентного зонда MitoTracker Green FM. Полученные результаты показали перспективность использования дрожжей *D. magnusii* для изучения вопросов

связанных с динамикой и дисфункцией митохондрий, что было реализовано при проведении дальнейших исследований.

В главе 2 этого раздела были приведены результаты опытов по сравнительному изучению влияния двух антиоксидантов (нового SkQThy и ранее синтезированного SkQ1) на изолированные митохондрии печени крысы, а также на клетки дрожжей. Было показано, что оба антиоксиданта стимулировали дыхание в состоянии 4 (т.е. обладали разобщающим действием), восстанавливались дыхательной цепью, снижали мембранный потенциал и в низких концентрациях снижали продукцию АФК митохондриями. Обнаружено, что SkQThy является наиболее эффективным из всех до сих пор исследованных антиоксидантов семейства SkQ. Кроме того, предварительная инкубация клеток *D. magnusii* с SkQThy не только предотвращала *t*-BHP-индукционную фрагментацию митохондрий, но также могла восстанавливать митохондриальный ретикулум после его фрагментации под влиянием прооксиданта.

В следующей главе аналогичное исследование было проведено в отношении двух прооксидантов - SkQN и MitoK3. Было показано, что оба вещества в низких концентрациях активировали продукцию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> митохондриями печени крысы, при этом прооксидантный эффект SkQN был более выражен. Оба прооксиданта вызывали деполяризацию внутренней мембранных дышащих митохондрий, ингибировали синтез АТФ, усиливали деполяризующее действие жирных кислот и индуцировали открытие неспецифической циклоспорин A-чувствительной поры (mPTP) во внутренней мемbrane органелл. Хорошо известно, что индукция mPTP в состоянии высокой проводимости, как правило приводит к гибели клеток, в том числе, по пути ПКС, у животных, растений и дрожжей. Это было подтверждено при дальнейшем изучении действия указанных прооксидантов на клетки дрожжей *D. magnusii*.

В Главе 4 было изучено влияние окислительного стресса (ОС), индуцируемого *t*-BHP на фрагментацию митохондрий в клетках дрожжей *D. magnusii* и возможность использования тестируемых антиоксидантов для регуляции этого процесса. За развитием ОС следили с использованием флуоресцентных зондов (MitoSox Red и H<sub>2</sub>DCF-DA), которыми нагружались клетки до воздействия прооксиданта. Результаты исследований показали, в частности, что ОС, индуцированный *t*-BHP развивался вначале только в митохондриях, а затем охватывал всю клетку (т.н. генерализованный ОС). Фрагментация митохондрий предшествовала генерализованному ОС. Интересно,

что тестируемые антиоксиданты снижали продукцию АФК митохондриями, но лишь незначительно снижали генерализованный ОС.

В завершающей части раздела (Глава 5) представлены очень интересные результаты по выявлению взаимосвязи между ОС, фрагментацией митохондрий и митофагией в дрожжах *S. cerevisiae*. В успешном выполнении данной части работы определяющую роль сыграло использование мутантов с делециями генов, кодирующих некоторые ключевые белки, участвующие в процессах фрагментации митохондрий и митофагии. В частности, было показано, что ОС, вызванный *t*-БНР, приводил к фрагментации митохондрий и митофагии в клетках *S. cerevisiae* дикого штамма. У мутантов с удаленными белками Dnm1 и Fis1 ответственными за деление митохондрий, ОС не вызывал полной фрагментации митохондриального ретикулума. Мутанты *S. cerevisiae*, лишенные белка Atg8 ответственного за образование фагофора, в отличие от дрожжей дикого типа также не обнаруживали фрагментации митохондрий и митофагии в присутствии *t*-БНР. Кроме того, в присутствии прооксиданта у этого штамма значительно возрастала клеточная смерть, что свидетельствовало о защитной роли митофагии в поддержании жизни клетки в условиях ОС.

В завершение рассмотрения этого раздела следует отметить хороший иллюстративный материал диссертации. Яркие четкие фотографии, хорошо продуманные и тщательно выполненные рисунки существенно облегчают понимание полученных данных.

В разделе «Заключение» автор, кратко анализирует полученные результаты, отмечает наиболее важные из них, предлагает пути и перспективы их развития и применения. Поскольку этого раздела, к сожалению, нет в автореферате, представляется необходимым еще раз перечислить наиболее яркие, на наш взгляд, результаты диссертационной работы:

а) проведено всестороннее исследование новых митохондриально-направленных веществ, антиоксиданта SkQThy и прооксиданта SkQN, на биоэнергетические параметры митохондрий и морфологию этих органелл в дрожжевых клетках. Полученные результаты показали высокую эффективность этих препаратов, что позволяет считать их перспективными для профилактики и лечения различных заболеваний;

б) в дрожжах *D. magnusii*, обладающих активной динамикой митохондрий изучено развитие во времени ОС, приводящего к фрагментации митохондрий и гибели клеток. Показано, что фрагментация митохондрий всегда предшествовала генерализованному ОС и была связана с внутримитохондриальными АФК;

в) изучено влияние различных белков, участвующих в процессе фрагментации митохондрий и митофагии в устойчивости дрожжей *S.cervisiae* к ОС. Полученные результаты свидетельствуют, что фрагментация митохондрий и митофагия могут выполнять защитную функцию при ОС, препятствуя гибели клеток дрожжей.

**Достоверность и аprobация полученных результатов** не вызывает сомнений. Результаты работы доложены на российских и международных конференциях и симпозиумах. По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в ведущих отечественных и зарубежных журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 12 тезисов в материалах конференций.

**Выводы** обоснованы и соответствуют поставленным задачам исследования и полученным результатам. Автореферат диссертации включает в себя все необходимые разделы и в целом соответствует содержанию диссертации.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Необходимо отметить, что полученные Т.Н. Голевой результаты позволили подтвердить представление о роли динамики митохондрий и митофагии в качестве важных защитных механизмов, предотвращающих гибель клеток, в данном случае, клеток дрожжей в условиях окислительного стресса. С учетом того, что фрагментация митохондрий в условиях ОС может быть одним из первичных маркеров ряда нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Алцгеймера, полученные в работе результаты показывают, что предотвращение фрагментации митохондрий, например, с использованием митохондриально-направленных антиоксидантов, может стать новым подходом в лечении таких болезней. Судя по результатам диссертационной работы, одним из таких наиболее эффективных митохондриально-направленных антиоксидантов может быть SkQThy. Таким образом, полученные в работе результаты будут способствовать развитию новых подходов в биохимических и медико-биологических исследованиях.

**Замечания.** Научная ценность работы и новизна полученных результатов не вызывают сомнений. Вместе с тем при анализе диссертационной работы и ее автореферата возник ряд замечаний:

1. Формулировки цели исследования и поставленных задач в автореферате и тексте диссертации частично не совпадают.

2. В «Обзоре литературы» было бы желательно иметь отдельную главу, посвященную процессу гибели клеток и ее особенностям у дрожжей.

3. В разделе «Материалы и методы» отсутствует методика определения восстановления SkQThy и SkQN компонентами дыхательной цепи (рис. 2.1.3., рис. 3.1.2.).

4. Следовало бы привести заключение, имеющееся в диссертации, в автореферате.

5. В «Списке литературы» нет единообразия стиля в написании названий статей.

6. Хотелось бы услышать мнение автора по поводу использования «ионов Скулачева» в медицинской практике, а также о применении прооксидантов при лечении раковых заболеваний.

### **Заключение.**

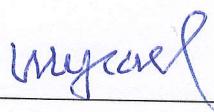
Несмотря на имеющиеся замечания, диссертационная работа Голевой Татьяны Николаевны «Дисфункция и фрагментация митохондрий, митофагия и гибель клеток дрожжей» производит хорошее впечатление и является завершенной научно-квалификационной работой. Она представляет собой серьезное исследование в одной из наиболее актуальных областей современной биохимии и биологии дрожжей. Автором получены новые данные об участии митохондриальной системы в реакции клеток дрожжей на окислительный стресс, а также дана характеристика новых митохондриально-направленных антиоксидантов и прооксидантов. Актуальность рассматриваемых вопросов, новизна, достоверность, обоснованность научных положений, научно-практическая значимость полученных результатов свидетельствуют о том, что диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (ред. от 11.09.2021), а ее автор Голева Татьяна Николаевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Диссертация Голевой Татьяны Николаевны «Дисфункция и фрагментация митохондрий, митофагия и гибель клеток дрожжей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, заслушана, отзыв на нее заслушан и утвержден на заседании лаборатории дыхания растений и механизмов его регуляции института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН 11 мая 2023 г., протокол №1; основное научное направление лаборатории соответствует тематике диссертации.

Отзыв на диссертацию Голевой Т.Н. подготовлен заведующим лабораторией дыхания растений и механизмов его регуляции института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН Шугаевым Александром Григорьевичем.

11 мая 2023 г

Заведующий лабораторией дыхания растений и механизмов его регуляции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, доктор биологических наук (специальность 1.5.21 – «Физиология и биохимия растений»)

 Шугаев Александр Григорьевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, адрес: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35, Рабочий телефон: +7 (499) 678-53-40.

E-mail: [ag\\_shugaev@ippras.ru](mailto:ag_shugaev@ippras.ru), [ag-shugaev@ifr.moscow](mailto:ag-shugaev@ifr.moscow)



Шугаев Шугаева А.Г.  
подтверждено  
руководителем по кадрам  
М.А. Богословская  
05.05.2023г.