ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

| аттестационное дело № | | |
|------------------------|-----------------------|--|
| аттестапионное дело л≌ | тото Мо | |
| | аттестационное дело № | |

Решение диссертационного совета от 08.06. 2023 г. № 13 о присуждении Голевой Татьяне Николаевны, гражданство Российская Федерация, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «ДИСФУНКЦИЯ И ФРАГМЕНТАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ, МИТОФАГИЯ И ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ» по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 14 марта 2023 г. (протокол № 5) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк, от 10 февраля 2014 года № 55/нк, от 30.09.2015 №1166/нк, 13 марта 2019 года № 222/нк, от 03.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. № 501/нк.

Соискатель

Голева Татьяна Николаевна (1991 года рождения) в июне 2015 г. окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет» по направлению «Биология», и в 2015 г. поступила в очную аспирантуру Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» института биохимии им. А.Н. Баха лаборатории

биоэнергетики, где работала и продолжает работать в должности младшего научного сторудника.

Диссертационную работу соискатель Голева Т.Н. выполняла в лаборатории биоэнергетики института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель:

Звягильская Рената Александровна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биоэнергетики института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Официальные оппоненты:

Миронова Галина Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией митохондриального транспорта ФГБУН института Теоретической и экспериментальной биофизики РАН;

Кулаковская Татьяна Валентиновна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции биохимических процессов ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН;

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, профессор Миронова Галина Дмитриевна является одним из ведущих отечественных специалистов в области митохондриологии;

тем, что доктор биологических наук, профессор Кулаковская Татьяна Валентиновна является одним из ведущих отечественных специалистов в области биохимии дрожжей;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Голевой Татьяны Николаевны.

Ведущая организация:

ФГБУН институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН в своем положительном отзыве, подписанном Шугаевым Александром Григорьевичем, доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником, заведующим

лабораторией дыхания растений и механизмов его регуляции и утвержденном директором ФГБУН института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН Лосем Д.А., член-корр. РАН, указала, что диссертационная работа Голевой Татьяны Николаевны является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Голева Татьяна Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности — 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что ФГБУН институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН является одним из ведущих отечественных институтов, проводящим исследования и прикладные разработки в области физиологии и биохимии растений. Таким образом, сотрудники ФГБУН института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, в частности, лаборатории дыхания растений и механизмов его регуляции, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Голевой Татьяны Николаевны.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы Голевой Татьяны Николаевны изложены в 6 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

- 1) Rogov A.G., Ovchenkova A.P., Goleva T.N., Kireev I.I., Zvyagilskaya R.A. New yeast models for studying mitochondrial morphology as effected by oxidative stress and other factors // Anal Biochem. − 2017. − V. S0003-2697, № 17. − P. 30161 − 30166.
- 2) Рогов А.Г., Голева Т.Н., Тренделева Т.А., Овченкова А.П., Аливердиева Д.А., и Звягильская Р.А. Новые данные о сравнительном действии SkQ1 и SkQT1 на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей. // Биохимия 2018. –Т. 83, №5. С. 552-561.

- 3) Goleva T., Rogov A., Korshunova G., Trendeleva T., Mamaev D., Aliverdieva D., Zvyagilskaya R. SkQThy, the novel promising mitochondria-targeted antioxidant // Mitochondrion 2019. V. 49, P. 206-216.
- 4) Rogov A.G., Goleva T.N., Sukhanova E.I., Epremyan K.K., Trendeleva T.A., Ovchenkova A.P., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. Mitochondrial Dysfunctions May Be One of the Major Causative Factors Underlying Detrimental Effects of Benzalkonium Chloride // Oxid Med Cell Longev. 2020 10;2020:8956504. doi: 10.1155/2020/8956504. eCollection 2020.
- 5) Goleva T.N., Lyamzaev K.G., Rogov A.G., Khailova L.S., Epremyan K.K., Shumakovich G.P., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Marmiy N.V., Zinevich T.V., Esipov D.S., Zvyagilskaya R.A., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted 1,4-naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. − 2020. −V. 1861, №8 148210. doi: 10.1016/j.bbabio.2020.148210.
- 6) Rogov A.G., Goleva T.N., Epremyan K.K., Kireev I.I., Zvyagilskaya R.A. Propagation of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species within the *Dipodascus magnusii* Cells. Antioxidants 2021, 10, 120. https://doi.org/10.3390/antiox10010120.

Результаты работы также были представлены на 4 международных и 6 российских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций) в частности: XI Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» — 2016, Mockba; International Conference «Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases» —2016, Долгопрудный; XXIX - XXXII Зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» — 2017, 2018, 2019, 2020 Москва; Международный молодежный научный форум Ломоносов — 2018, 2019, Москва. Згd International Conference «Ното Sapiens Liberatus» — 2020, Moscow; 3-й Российский микробиологический конгресс — 2021, Псков.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ Мироновой Галиной Дмитриевной (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 1. Для лучшего понимания взаимосвязи белков митофагии между собой и вклада автора в данную тему хотелось бы видеть сводную схему исследованных белковых взаимодействий.
- 2. Исследуемый препарат- SrQThy это новый недавно синтезированный препарат. Существуют ли данные о его терапевтическом действии на моделях животных с заболеваниями, сопровождающимися развитием окислительного стресса, и если да, то проведено ли сравнение его терапевтического действия с уже известным таковым действием SkQ1.
- 3. Есть ли литературные данные о сравнении действия SkQ1 на этих и других моделях, с действием, например, наиболее сильного антиоксиданта дигидрокверцетина (ДГК), и обладает ли ДГК прооксидантрым действием при высоких концентрациях.
- 4. Существуют ли в литературе данные о проникновении ДГК или других известных антиоксидантов в митохондрии, или они действуют только снаружи митохондрий.
- 5. Как и когда выводятся SkQ1, SrQThy и SkNO из организма. Не могут ли они накапливаться в клетке, тем более что в работе делаете заключение, что они могут долго функционировать в митохондриях. Не опасно ли такое их долгое функционирование в митохондриях.
- 6. Так как автор предполагает, что SkNO перспективен для лечения рака, известно ли о его влиянии на нормальные клетки, или он действует только на патологические.
- 7. Почему в списке литературы все русские статьи даны в английском варианте. В работе упоминаются английские слова, которые имеют русские эквиваленты.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Кулаковской Татьяны Валентиновны (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- К числу недостатков работы относится отсутствие иллюстраций в разделе «Обзор литературы». Схемы, иллюстрирующие известные данные о динамике митохондрий или роли отдельных белков в этом процессе, несомненно, улучшили бы понимание этого насыщенного информацией раздела. Также хотелось бы видеть в разделе «Заключение» схему, иллюстрирующую общие принципы динамики митохондрий и отдельные процессы, в понимание которых автор внес вклад своей работой.
- Возможно, формулировки выводов: «может быть полезным для облегчения патологий, связанных с окислительным стрессом», и «может быть рекомендован в качестве терапевтического препарата для борьбы с некоторыми видами рака» на данном этапе исследований могли бы быть смягчены до следующих: «Изученные

- соединения являются перспективными для будущей разработки терапевтических препаратов...».
- К числу недостатков работы следует отнести большое количество опечаток. Они присутствуют, в том числе и в разделе «Выводы». Например, вывод 1: «SkQThy является наиболее эффективный антиоксидантом» (наиболее эффективным). Вывод 2: «боле глубокие разрушения» (более глубокие).
- Встречаются неудачные выражения, например «среда была ... дополнена ... митохондриями».
- Хотелось бы узнать мнение автора по следующим вопросам:
- Для прооксиданта SkQN в диссертации приводятся данные о цитотоксическом действии на культивируемые клетки человека. Действительно, эти данные являются основой для дальнейшего изучения данного вещества в качестве противоракового агента. Продолжаются ли эти исследования и получены ли новые результаты в направлении изучения перспектив данного соединения в разработке новых лекарственных средств? Проводились ли подобные исследования антиоксиданта SkQThy?
- - С какими особенностями структуры, по мнению автора, связаны различия в эффективности действия новых, изученных в работе, антиоксиданта и прооксиданта и известных ранее соединений этого класса, примененных в диссертации для сравнительного анализа?
- Возможно ли на основании проведенных исследований сформулировать предположение о том, каким именно образом белки Atg5 и Mdm10 участвуют в поддержании нормальной структуры митохондрий?

Отзыв ведущей организации ФГБУН института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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 SkQTy 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 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.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Крестининой Ольги Владимировны, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории Фармакологической регуляции клеточной резистентности Федерального государственного бюджетного учреждения науки, института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, замечаний нет;

Зоровой Любавы Дмитриевны, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории структуры и функции митохондрий, отдела функциональной биохимии биополимеров, научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, замечаний нет;

Круглова Алексея Георгиевича, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории тканевой инженерии Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

В отзыве имеются следующие вопросы:

Во-первых, использования термина «нормоксия» для обозначения условий отсутствия окислительного стресса представляется не вполне корректным.

Во-вторых, вызывает вопрос эффективность подхода к коррекции патологических состояний митохондрий, основанный на применении потенциал-зависимых анти- и прооксидантов. Действительно, митохондрии с высоким уровнем продукции АФК могут иметь более низкий потенциал, чем нормальные. Для раковых клеток характерен пониженный уровень митохондриального метаболизма. Не будет ли это снижать эффективность и селективность доставки потенциал-зависимых препаратов?

В-третьих, вызывает вопрос тоничность среды для измерения набухания митохондрий. Согласно данным, приведенным в автореферате его осмолярность должна составлять около 450 мОсМ. Можно ли считать данную среду инкубации достаточно (пато)физиологичной?

В-четвертых, в автореферате не указано, какой уровень флуоресценции H2DCFDA в экспериментах на проточном цитометре соответствовал окислительному стрессу и как был выбран этот порог.

В-пятых, в автореферате на Рис. 10 показаны две кривые: флуоресценция MitoSox Red (с выходом на плато) и флуоресценция DCF в экспоненциальной фазе роста. Однако Автор не приводит каких-либо доказательств или контролей, которые бы показали, что

в митохондриях еще присутствует MitoSox Red, способный детектировать супероксид анион.

С вопросами выступали:

проф., д.х.н. Савицкий А.П., д.б.н. Терёшина В.М., д.фарм.н. Макаров В.А., проф., д.б.н. Шишкин С.С., проф., д.х.н. Дзантиев Б.Б.

В дискуссии приняли участие:

проф., д.б.н. Шишкин С.С., д.б.н. Агафонов М.О.

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

- В работе было детально изучено влияние окислительного стресса на клетки дрожжей типа обмена. Исследовано действие нового митохондриальнонаправленного антиоксиданта SkQThy на биоэнергетические параметры выделенных митохондрий и морфологию митохондрий в дрожжевых клетках. Показана его эффективность как антиоксиданта и отсутствие прооксидантного действия во всем концентраций, диапазоне исследованных что важно для перспективного терапевтического препарата.
- Исследован новый митохондриально-направленный препарат SkQN, показано его прооксидантное действие. Проведено сравнительное исследование SkQN с другим митохондриально-направленным прооксидантом MitoK3. Показано, что SkQN является более эффективным прооксидантом, чем MitoK3 и что сами по себе митохондриальные прооксиданты не являются разобщителями, деполяризующими агентами, ингибиторами синтеза ATP или «открывателями» неспецифической поры, а их разобщающее, деполяризующее и ингибирующее действиея обусловлены взаимодействием с жирными кислотами. В клетках дрожжей SkQN и MitoK3 индуцировали окислительный стресс, приводящий к фрагментации митохондрий и частичной гибели клеток. На основании полученных данных можно полагать, что SkQN и MitoK3 могут быть перспективными агентами в борьбе с раковыми заболеваниями.
- В клетках дрожжей *D. magnusii*, имеющих в норме разветвленный митохондриальный ретикулум, показано развитие индуцированного прооксидантом окислительного стресса. Фрагментация митохондрий всегда предшествовала генерализованному окислительному стрессу, и, вероятно, была связана с внутримитохондриальными

- АФК. Предварительная инкубация клеток с митохондриально-направленным антиоксидантом SkQ1 снижала интенсивность окислительного стресса.
- Изучено влияние различных белков митофагии на устойчивость дрожжей к окислительному стрессу. Митофагия у дрожжей происходит даже при ингибировании митохондриального деления. Показано, что белки ERMES точки контакта эндоплазматического ретикулума и митохондрий, в особенности Mdm10, необходимы для поддержания нормальной структуры митохондрий. Полученные данные свидетельствуют о том, что фрагментация митохондрий дрожжей может нести защитную функцию при окислительном стрессе или нарушениях функций митохондрий.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:

Полученные данные указывают на участие фрагментации митохондрий и митофагии в качестве защитных механизмов при действии на клетки окислительного стресса. Впервые показано, что фрагментация митохондрий, связанная скорее всего с митохондриальными активными формами кислорода, всегда предшествовала развитию генерализованного (в объеме всей клетки) окислительного стресса.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

Проведена детальная характеристика влияния новых антиоксиданта и прооксиданта на состояние митохондрий печени крысы и реакцию дрожжевых клеток на окислительный стресс. Тот факт, что фрагментация митохондрий является первичным маркером ряда нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, означает, что предотвращение фрагментации митохондрий может быть новой стратегией в борьбе с нейродегенеративными заболеваниями.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение.

Диссертация соискателя Голевой Т.Н. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также публикациями в рецензируемых журналах (6 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и имеет значение для изучении митохондриально-направленных веществ с высоким терапевтическим потенциалом.

На заседании 8 июня 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Голевой Татьяне Николаевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 11 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – 20,

«Против» - нет,

Недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета ФИЦ биотехнологии РАН, д.х.н., профессор Академик РАН

Ученый секретарь диссертационного совета ФИЦ биотехнологии РАН кандидат биологических наук



«8» июня 2023 г.