ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Актуальность темы диссертации. Диссертационная работа Татьяны Николаевны Голевой посвящена изучению закономерностей физиологии митохондрий в условиях окислительного стресса, а также анализу влияния на состояние митохондрий новых прооксидантов и антиоксидантов. В связи с тем, что окислительный стресс сегодня рассматривается как первопричина или неотъемлемая часть патологических состояний эукариотической клетки, тема диссертации является актуальной как в фундаментальном отношении, так и в свете решения научных проблем в рамках приоритетного направления: «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов.» Вполне оправданным является выбор объектов исследования: митохондрий печени крысы, как представителя млекопитающих и клеток трех видов дрожжей: *S. cerevisiae,* как традиционной модели, для которой доступны любые необходимые в работе мутантные штаммы, дрожжей *Dipodascus magnusii*, имеющих большой размер клеток, что облегчает визуализацию процессов изменения морфологии митохондрий, а также дрожжей *Yarrowia lipolytica*, характеризующихся специфическими особенностями окислительного обмена.

Достоверность и новизна. В работе применены современные биохимические и микроскопические методы, в том числе методы определения АТФ, специальные методики оценки состояния митохондрий, цитофлуориметрические и микроскопические методы с применением различных специфических красителей. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности с использованием необходимых контролей. Статистический анализ проводился с помощью одностороннего теста ANOVA.

Научная новизна представленной диссертационной работы не вызывает сомнений. Исследованы свойства нового антиоксиданта SkQThy, транспортирующегося преимущественно в митохондрии, показана его эффективность в предотвращении фрагментации митохондрий и гибели клеток в условиях окислительного стресса. Исследованы свойства нового митохондриально направленного прооксиданта SkQN, показана его увеличенная эффективность в сравнении с другим митохондриально направленным прооксидантом MitoK3. Впервые прослежена динамика развития окислительного стресса у дрожжей, начинающегося с изменений в состоянии митохондрий, их фрагментации, а затем захватывающего всю клетку. Показано, что у пекарских дрожжей процесс митофагии является необходимым для устойчивости к окислительному стрессу.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. В ходе выполнения диссертационного исследования автором проведен значительный объем экспериментов, проведенных на высоком методическом уровне. Результаты исследований подвергнуты грамотной обработке. Полученные данные, сформулированные научные положения и выводы сопоставлены с опубликованными ранее результатами других исследователей. Все это позволяет считать научные положения и выводы вполне обоснованными.

Значимость для науки и практики.

(1) - Установлено, что фрагментация митохондрий и митофагия входят в число защитных механизмов в условиях окислительного стресса. Доказано, что фрагментация митохондрий предшествует окислительному стрессу на уровне целых клеток. Выдвинута концепцию о том, что ингибирование фрагментации митохондрий может стать новой стратегией в борьбе с нейродегенеративными заболеваниями.

(2) Разработаны новые экспериментальные модели для изучения морфологии митохондрий и ее изменений в стрессовых условиях на примера видов дрожжей, различающихся по особенностям метаболизма и морфологии клеток

(3) Проведена детальная характеристика влияния новых антиоксиданта и прооксиданта на состояние митохондрий и реакцию клеток на окислительный стресс.

Результаты, полученные Т.Н. Голевой, позволяют рекомендовать изученные в работе новые антиоксиданты и прооксиданты для дальнейших исследований с целью разработки новых лекарственных препаратов против заболеваний, при которых окислительный стресс является важной частью патологических процессов.

Структура и содержание диссертации, ее завершенность. Работа изложена на 103 страницах печатного текста, содержит 43 рисунка. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (150 источников). Во «Введении» автор обосновывает актуальность темы диссертационного исследования и степень ее разработанности, формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, приводит сведения о научной новизне и научно-

практическом значении работы, а также об апробации работы на всероссийских и международных конференциях, публикациях по теме диссертации, демонстрирует личный вклад автора.

Раздел «Обзор литературы» содержит подробный анализ современного состояния проблемы и состоит из трех глав. В Главе 1 изложены сведения об окислительном стрессе в живых клетках, о роли активных форм кислорода, а также о значении данных процессов в процессе старения. Здесь же приводится сравнительный анализ уже применяемых в научной и медицинской практике общих и митохондриально направленных антиоксидантов. В Главе 2 детально описаны динамические изменения митохондрий, в том числе в процессах их деления и слияния, а также роль отдельных белков дрожжей в этих динамических изменениях. Глава 3 посвящена митофагии, роли отдельных сигнальным систем и белков в этом процессе, в том числе и при окислительном стрессе.

В разделе «Материалы и методы исследования» подробно описаны объекты исследования и методы их культивирования, методы анализа состояния митохондрий, использованные в работе аналитические методы, дается детальный перечень реагентов, что особенно важно в случае специфических красителей, применяемых для флуоресцентной микроскопии.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 4-х глав с несколькими подглавами.

В Главе 1 подробно и убедительно обосновано использование относительно редких объектов, дрожжей *Dipodascus magnusii*, имеющих большой размер клеток, и дрожжей *Yarrowia lipolytica,* характеризующихся значительными изменениями морфологии клеток и митохондрий в зависимости от условий культивирования, а также приводятся хорошо иллюстрированные сведения о динамике митохондрий этих видов в разных условиях.

Глава 2.1 посвящена влиянию нового антиоксиданта SkQThy митохондрии печени крысы и сравнению его действия с известным ранее соединением, обладающими сходными свойствами. Глава 2.2 посвящена аналогичным исследованиям, но уже с использованием клеток дрожжей в качестве объекта. Глава 3.1. посвящена влиянию прооксиданта SkQN на митохондрии печени крысы и сравнение с известным ранее прооксидантом MitoK3. Глава 3.2 посвящена аналогичным исследованиям на клетках дрожжей. Такая организация материала является удачной, поскольку позволяет видеть сравнительную картину действия изучаемых соединений на разных видах эукариот. Глава 4 описывает фрагментацию митохондрий в связи с окислительным стрессом у дрожжей. Глава 5 описывает влияние мутаций по различным важным белкам митохондрий на развитие митофагии. Работу завершают краткое «Заключение» и «Выводы».

Анализируя работу в целом, следует отметить, что исследование хорошо продумано и аккуратно выполнено. Цель работы четко сформулирована. Задачи соответствуют цели исследования. Автором применены современные биохимические и цитофлуориметрические и микроскопические методы и подходы, в том числе разработанные в лаборатории, где выполнялась работа. Рисунки и таблицы выполнены качественно и хорошо иллюстрируют полученные автором результаты.

Выводы по работе представляются достаточно полными и убедительными.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати.

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 6 статьях в зарубежных и отечественных журналах, входящих в перечень рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ и имеющих высокий импакт-фактор, результаты работы также были

представлены в виде 12 тезисов в материалах научных конференций.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации. Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы. Несомненным достоинством работы является использование современных биохимических и микроскопических методов, в том числе цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Фотографии митохондрий в разном состоянии выполнены четко и хорошо иллюстрируют положения диссертации. Детальная характеристика двух новых соединений, влияющих на процесс окислительного стресса в эукариотических клетках представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

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?

В целом сделанные замечания не снижают общей высокой оценки рассматриваемой диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Голевой Татьяны Николаевны «Дисфункция и фрагментация митохондрий, митофагия и гибель клеток дрожжей» является завершенной научно-квалификационной работой. Автором получены новые данные об участии митохондриальной системы в реакции живых клеток 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.

Кулаковская Татьяна Валентиновна,
доктор биологических наук, специальность 1.5.4. Биохимия
ведущий научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», обособленное структурное подразделение - Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, лаборатория регуляции биохимических процессов
142290, г. Пущино, Московская обл., Россия, пр. Науки 5
E-mail: alla@ibpm.ru
Тел.: 8 (4967) 73-05-00

03.05.2023.

Подпись Т.В. Кулаковской заверяю

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
Российской академии наук - обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Подпись Кулаковской Т.В. удостоверяю
Заведующий канцелярией