

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.225.02,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ

КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 23.06.2022 № 19

О присуждении **Степановой Анастасии Евгеньевне**, гражданке РФ,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация **«Ca²⁺-зависимая агрегация и пермеабиллизация биологических и искусственных мембран продуктами ω-окисления жирных кислот: механизмы и возможная роль в патологии клетки»** по специальности 1.5.2 – биофизика принята к защите 30 марта 2022 г. (протокол заседания № 11) диссертационным советом 24.1.225.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский Научный Центр Российской академии наук» (ФИЦ КазНЦ РАН) Министерства образования и науки Российской Федерации 420111, г. Казань, ул. Лобачевского д. 2/31 (приказ Минобрнауки РФ №788/нк от 09.12.2020 г.).

Соискатель, Степанова Анастасия Евгеньевна, 15.09.1992 года рождения, в 2014 году окончила ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет». В 2019 году окончила очную аспирантуру при ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет» по специальности «Биофизика» (приказ №1644-ЛС от 19.09.2019).

Работает преподавателем кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии в ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация Степановой А.Е. выполнена в научно-исследовательской лаборатории молекулярной биоэнергетики, кафедре биохимии, клеточной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Дубинин Михаил Васильевич, доцент кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет».

Официальные оппоненты:

1. **Литвинова Лариса Сергеевна** – доктор медицинских наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессор кафедры фундаментальной медицины медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»;

2. **Бережнов Алексей Валерьевич** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Оба оппонента дали положительные отзывы на диссертационную работу Степановой Анастасии Евгеньевны.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва – в своем

положительном отзыве, подписанном Плотниковым Егором Юрьевичем, доктором биологических наук, профессором РАН, заведующим лабораторией структуры и функции митохондрий и к.б.н. Фенюк Борисом Александровичем, зам. директора Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, указали, что представленная диссертационная работа имеет значение для фундаментальной науки в области функционирования и регуляции проницаемости биологических мембран в норме и в условиях патологий. Результаты проведенной диссертантом работы могут быть использованы в научных подразделениях, занимающихся биофизикой липидных мембран, биоэнергетикой митохондрий, а также клеточной патофизиологией, поскольку в настоящее время показано, что уровень продуктов ω -окисления жирных кислот в клетках печени значительно увеличивается при ожирении, голодании и различных формах сахарного диабета. Продемонстрированный соискателем в процессе работы научный уровень отвечает требованиям, предъявляемым к уровню работ на соискание ученой степени кандидата наук. Степанова А.Е. заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных информационно-аналитических системах научного цитирования, входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК. В материалах всероссийских и международных конференций опубликовано 7 работ. Общий объем опубликованных по теме диссертации работ составляет 4 печатных листа. Работы написаны соискателем в соавторстве с другими исследователями, личный вклад диссертанта заключается в выполнении основной части модельных экспериментов, в анализе литературных данных и обобщении полученных результатов.

Диссертационная работа не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Дубинин М.В. Индукция Ca^{2+} -зависимой агрегации и пермеабилзации эритроцитов ω -гидроксипальмитиновой и α,ω -гексадекандиовой кислотами. [Текст] / Дубинин М.В., **Степанова А.Е.**, Щербаков К.А., Самарцев В.Н., Белослудцев К.Н. // Биофизика. – 2016. – Т. 61. – Вып. 5. – С. 916 - 921. (ВАК, Scopus).
2. Dubinin M.V. Membranotropic effects of ω -hydroxypalmitic acid and Ca^{2+} on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization. [Текст] / Dubinin M.V., Samartsev V.N., **Stepanova A.E.**, Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2018. – V. 50. – P. 391-401. (ВАК, Scopus, Web of Science).
3. Дубинин М.В. Возрастная и тканевая особенности индукции α,ω -гексадекандикарбоновой кислотой кальций-зависимой пермеабилзации митохондрий крыс. [Текст] / Дубинин М.В., Теньков К.С., Старинец В.С., **Степанова А.Е.**, Белослудцев К.Н., Самарцев В.Н. // Журнал Эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55. – №1. – С. 73-75. (ВАК, Scopus, Web of Science).
4. Дубинин М.В. Сравнительное исследование эффектов пальмитиновой и ω -гидроксипальмитиновой кислот как индукторов Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондрий печени и лецитиновых липосом. [Текст] / Дубинин М.В., Самарцев В.Н., **Степанова А.Е.**, Семенова А.А., Хорошавина Е.И., Белослудцев К.Н. // Биофизика. – 2019. – том 64. – № 6. – С. 1115–1123. (ВАК, Scopus).

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов:

от д.б.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ, зав. лаб. митохондриального транспорта ИТЭБ РАН Мироновой Галины Дмитриевны,

отзыв положительный. Указана необходимость применения общеупотребимого термина «митохондрии печени» при постановке 3 задачи, а также дана рекомендация по стилистике приведенных терминов;

от д.б.н., доцента, рук. центра биофотоники ИОФ РАН Гудкова Сергея Владимировича, отзыв положительный. Рекомендовано дополнить данные диссертации экспериментальными данными, описывающими различия в белковом и липидном составе митохондрий разных органов. Отмечается необходимость улучшения качества некоторых рисунков, в частности, рис. 3. Также рекомендовано отказаться от тысячных дробей при представлении данных в таблице 1;

от д.б.н., профессора, зав. каф. биофизики и биотехнологии ВГУ Артюхова Валерия Григорьевича, отзыв положительный. Рекомендовано привести в работе коэффициенты распределения изучаемых жирных кислот, что позволит лучше понять механизмы их действия и охарактеризовать выявленные различия в эффективности;

от к.х.н., ассистента каф. технологии косметических средств КНИТУ Рыбаковой Алёна Ивановны, отзыв положительный, рекомендовано привести таблицу 1 в графическом виде;

от д.б.н., доцента, зав. каф. биофизики ННГУ им. Н.И. Лобачевского Воденеева Владимира Анатольевича, отзыв положительный, замечаний к содержанию и оформлению автореферата нет.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что они являются компетентными специалистами в области изучения патологий липидного обмена, в том числе процессов, связанных с дисфункцией митохондрий, что подтверждено их научными работами. Ведущая организация является признанным лидером в фундаментальных исследованиях, широко известна своими достижениями в исследованиях биоэнергетики и функционирования митохондрий, а также способна всесторонне оценить научную значимость диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны экспериментальные подходы, позволяющие оценить способность жирных кислот (ω -гидроксипальмитиновой и ω -гексадекандикарбоновой) индуцировать агрегацию липидных мембран клеток, митохондрий и лецитиновых липосом; *предложен* гипотетический механизм Ca^{2+} -зависимой неспецифической проницаемости липидных мембран клеток и митохондрий, способствующий индукции гибели клеток и деструкции органелл; *доказана* перспективность применения используемых в работе методов в области изучения механизмов агрегации и пермеабиллизации биологических и искусственных мембран.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что прояснение механизмов действия свободных жирных кислот расширяет представление о механизмах индукции неспецифической проницаемости липидного бислоя, играющего важную роль в функционировании клеток и их органелл. Полученные научные результаты дополняют сведения о молекулярных механизмах, лежащих в основе регуляции функционирования и проницаемости мембран клеток и митохондрий различных органов с помощью органических метаболитов и неорганических соединений и могут иметь значение для медико-биологических работ, касающихся исследования роли неспецифической проницаемости липидных мембран в различных патологических процессах, включающих такие социально значимые и распространенные заболевания, как ишемия, нейродегенеративные и нейромышечные заболевания, сахарный диабет.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплексный подход, включающий современные апробированные методы биофизики, биоэнергетики, мембранологии, в том числе спектрофлуориметрии, потенциометрии, микроскопии, динамической спектроскопии.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан подход, который может быть использован в последующих работах по созданию методов и средств управления процессом клеточной гибели путем изменения проницаемости мембран клеток и их органелл с помощью продуктов ω -окисления жирных кислот и модуляторов, ослабляющих их действие; *определены* перспективы практического использования полученных результатов для моделирования процессов перестройки и упаковки компонентов липидного бислоя биологических и искусственных мембран, ведущих к формированию их неспецифической проницаемости; *создан* задел для дальнейших исследований патологий липидного обмена, сопровождающихся накоплением продуктов ω -окисления жирных кислот в клетках и сыворотке крови.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что все результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования, проведена статистическая обработка полученных экспериментальных результатов. *Теория* построена на известных, проверяемых фактах, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации, а также данными, опубликованными в литературе; *идея* базируется на анализе собственных экспериментальных результатов и данных, имеющих в литературе; *использованы* современные методики сбора и обработки исходной информации.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и выполнении экспериментов, анализе и интерпретации полученных данных. В результате автором установлено, что продукты омега-окисления пальмитиновой кислоты (ω -гидроксипальмитиновой и ω -гексадекандикарбоновой) способны оказывать существенное влияние на проницаемость мембран клеток, митохондрий и искусственной мембраны

липосом. Основные результаты работы получены лично автором и представлены им на российских и международных конференциях.

В ходе защиты диссертации критических замечаний не было, при обсуждении возникли следующие вопросы:

Работа является «модельной», в организме эти кислоты превратятся в ацетил-КоА. Будут ли подобные эффекты, обнаруженные на выделенных органеллах и искусственных мембранах, проявляться на уровне целого организма?

Каким методом были получены выделенные митохондрии, как оценивали их качество и функциональное состояние?

Является ли исследование влияния на биологические и искусственные мембраны таких веществ, как ω -гидроксипроизводные жирных кислот и дикарбоновые жирные кислоты, совершенно «пионерским»?

Соискатель Степанова А.Е. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

Считаем, что в ходе дальнейшей работы над темой необходимо поставить эксперимент *in vivo* с развитием синдрома Рея на животных и отследить, как будут меняться концентрации жирных кислот, так как при синдроме Рея концентрации ω -производных жирных кислот могут увеличиваться. В этом случае они не успевают вступить в β -окисление и в избытке накапливаются в клетках.

Выделенные митохондрии из различных органов (печень, почка, сердце) получали по стандартной методике дифференциального центрифугирования. О функциональной активности органелл судили по дыхательному контролю, изменению оптической плотности суспензии, измерению трансмембранного электрического потенциала, концентрации ионов кальция и количества цитохрома *c* в инкубационной среде.

Данное исследование является продолжением тематики, изучаемой на нашей кафедре, и актуальность темы несомненна. Влияние ω -дикарбоновых кислот изучали на мембраны в присутствии кальция, в частности, на

митохондрии печени. В то же время, действие промежуточных продуктов, ω -гидроскикарбновых кислот, абсолютно не изучено. Также нет данных о тканевой специфичности эффектов этих кислот, возрастной зависимости действия и о влиянии на цитоплазматические мембраны клеток.

На заседании 23 июня 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Степановой Анастасии Евгеньевне ученую степень кандидата биологических наук за решение научной задачи выявления деталей механизмов кальций-зависимого действия продуктов ω -окисления свободных жирных кислот на биологические и искусственные липидные мембраны, а также за разработку способов пермеабилзации липидных мембран при участии жирных кислот, что может быть использовано для их направленной модификации с целью регуляции транспортных процессов в клетках и тканях и доставки целевых соединений, обладающих, в том числе, терапевтическим потенциалом.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 10 докторов наук по научной специальности 1.5.2 – биофизика, участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за - 17, против - 1, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель

диссертационного

совета, академик РАН

Гречкин Александр Николаевич

Ученый секретарь

диссертационного

совета, к.б.н.



Пономарева Анастасия Анатольевна

23.06.2022 г.