

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.038.01, СОЗДАННОГО  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ  
ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ПО  
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 23 октября 2024 года № 8

О присуждении Сушко Екатерине Сергеевне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем» по специальности 1.5.2. Биофизика принята к защите 19 июня 2024 года (протокол №5) диссертационным советом 24.1.038.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, по адресу: 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4; приказ Министерства образования и науки №105/нк от 11 апреля 2012 года.

**Соискатель** – Сушко Екатерина Сергеевна, 02 сентября 1993 года рождения, в 2017 году окончила магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» по направлению подготовки 03.04.02 «Физика». С 01 октября 2018 года по 30 сентября 2022 года обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» по специальности 03.01.02 – биофизика (1.5.2. Биофизика).

В период подготовки диссертации с 2018 года по настоящее время работает в Институте биофизики Сибирского отделения Российской академии наук –

обособленном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории фотобиологии, в настоящее время в должности младшего научного сотрудника.

**Диссертация выполнена** в лаборатории фотобиологии Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

**Научный руководитель – Кудряшева Надежда Степановна**, доктор физико-математических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории фотобиологии Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

**Официальные оппоненты:**

**Празднова Евгения Валерьевна**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики микробных консорциумов Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»;

**Камнев Александр Анатольевич**, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук»

**дали положительные отзывы на диссертацию.**

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» в своем положительном заключении, составленном доктором медицинских наук, профессором, научным руководителем лаборатории селекционно-генетических исследований в животноводстве Дерябиным Дмитрием Геннадьевичем и утвержденном директором, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН Лебедевым Святославом Валерьевичем, отмечает актуальность работы, поскольку использование биолюминесцентных тест-систем, преимуществом которых является простота и высокая скорость тестирования, является перспективным подходом, который позволил бы определить механизмы воздействия фуллеренолов на биологические системы и оценить их свойства в сопоставимых условиях. В отзыве подчеркнуто, что автор продемонстрировал, что токсичность фуллеренолов наблюдается при высоких концентрациях, в то время как их антиоксидантная активность проявляется при низких концентрациях. Эти свойства связаны с рядом структурных характеристик фуллеренолов, таких как соотношение полярных и неполярных фрагментов, содержание металлов в структуре и взаимодействие с гидрофобными фрагментами клеточных мембран. Обращает на себя внимание «гипотеза 1/2», которая формирует основу для прогнозирования токсичности и антиоксидантной активности фуллеренолов с различными структурными характеристиками. Расширение методов исследования биолюминесцентных систем от классического изучения кинетики биолюминесценции до современных спектральных методов для контроля условий эксперимента и выявления участия НАДН-зависимых редокс-процессов, а также совместное применение биолюминесцентных и хемилюминесцентного методов позволило отследить изменение содержания активных форм кислорода (АФК) в исследуемых смесях. В заключении отмечено, что полученные результаты достоверны, выводы обоснованы, соответствуют сути работы и позволяют говорить об

оригинальности и новизне обобщений. По актуальности, новизне, практической значимости и уровню проведенных исследований, диссертационная работа Сушко Екатерины Сергеевны удовлетворяет требованиям, установленным пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 ред. от 26.01.2023), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Соискатель имеет 19 опубликованных работ по теме диссертации, из них 8 статей в рецензируемых научных изданиях, цитируемых в Web of Science и Scopus, тезисы 11 докладов в сборниках трудов научных конференций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Sushko, E. S. Endohedral Gd-containing fullerenol: toxicity, antioxidant activity and regulation of reactive oxygen species in cellular and enzymatic systems / **E. S. Sushko**, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, N. S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23, № 9. – P. 5152.
2. Kovel (Sushko), E. S. Antioxidant activity and toxicity of fullerenols via bioluminescence signaling: Role of oxygen substituents / **E. S. Kovel (Sushko)**, A. S. Sachkova, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, E. M. Knyazeva, N. S. Kudryasheva // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20, № 9. – P. 2324.
3. Sachkova, A. S. On mechanism of antioxidant effect of fullerenols / A. S. Sachkova, **E. S. Kovel (Sushko)**, G. N. Churilov, O. A. Guseynov, A. A. Bondar, I. A. Dubinina, N. S. Kudryasheva // Biochemistry and Biophysics Reports. – 2018. – V. 9. – P. 1–8.

На автореферат поступило **4** положительных отзыва:

- 1) Отзыв д.б.н. **Тереховой Веры Александровны**, профессора кафедры земельных ресурсов и оценки почв Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», содержит следующие

вопросы: 1. Является ли биолюминесцентная методика изучения антиоксидантной активности наночастиц фуллеренолов оригинальной или она разработана другими авторами? 2. Хорошо бы дать пояснение выбору модельных окислителей. Могут ли столь успешно применяться другие химические соединения (например, какие?) для моделирования окислительного стресса? 2) В отзыве к.б.н. **Сутормина Олега Сергеевича**, заведующего кафедрой химии Института естественных и технических наук бюджетного учреждения высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет» приведены следующие вопросы: 1. Существуют ли какие-либо российские и/или международные нормативы и/или стандарты, определяющие безопасность фуллеренолов в продукции медицинского и фармацевтического назначения, и насколько полученные в работе Е.С. Сушко диапазоны концентраций с низкой токсичностью фуллеренолов согласуются с этими нормативами и/или стандартами? 2. На стр. 15 автореферата автор описывает достаточно интересное явление, при котором для гадолиний-содержащего фуллеренола в небιологической системе имеет место уменьшение содержания АФК при концентрациях фуллеренолов  $< 10^{-4}$  г/л, и увеличение содержания АФК при больших концентрациях. При этом из приведенного автором текста, остается неясно объяснение механизма наблюдаемого явления? 3) Отзыв к.б.н. **Торгашиной Ирины Геннадьевны**, доцента кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» содержит следующие замечания: 1. При оценке токсического эффекта фуллеренолов на бактериальные культуры рассматривается только показатель биолюминесценции и не рассмотрены другие показатели их жизнедеятельности, например, скорость роста культуры или скорость гибели. 2. Несколько неясной является схема эксперимента, ее стоило бы добавить. Судя из описаний эксперимента в работе рассматривается токсическое действие фуллеренолов как эффект острой

токсичности и не рассматривается эффект хронической токсичности. 4) Отзыв к.х.н. **Михеева Ивана Владимировича**, доцента химического факультета, кафедры аналитической химии, лаборатории спектроскопических методов анализа Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» без замечаний.

В отзывах отмечено, что тема диссертации является актуальной и имеет важное прикладное значение: разработанные биолюминесцентные методы и подходы к анализу биологической активности фуллеренолов могут также использоваться в экологии, фармакологии и медицине для определения и сравнения антиоксидантной активности и токсических свойств биологически активных веществ. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием высокоточных методов регистрации кинетики биолюминесценции, хемилюминесценции и поглощения веществ.

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации** обосновывается их специализацией по проблеме настоящей диссертационной работы и достижениями в области биофизики, в том числе изучения биологической активности веществ, а также наличием публикаций в соответствующей сфере исследования, что позволяет им оценить научную и практическую значимость диссертации. Оппонент д.б.н. Празднова Е.В. является ведущим специалистом в области изучения биологической активности веществ, в том числе фуллерена  $C_{60}$ , а также оценки биологической активности антиоксидантов и токсичности химических веществ, генерирующих активные формы кислорода. Оппонент д.х.н., профессор Камнев А.А. является ведущим специалистом в области молекулярной биофизики, физиологии и метаболизма микроорганизмов, в том числе физиологии и изучения физико-химических параметров роста микроорганизмов, микробной экологии и биогеохимии, бионанотехнологии и наномедицине, включая применение наноматериалов в биотехнологии и медицине, использование биологических молекул в нанотехнологических целях.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук» является одним из ведущих центров в области изучения биологической активности различных объектов с использованием билюминесцентных бактерий.

**Диссертационный совет отмечает**, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработаны** подходы к анализу биологической активности нанообъектов, с использованием билюминесцентного, хемиллюминесцентного и спектрофотометрического методов, позволяющих сравнивать их токсические и антиоксидантные свойства;

**предложена** оригинальная научная «гипотеза  $\frac{1}{2}$ », основанная на соотношении полярных и неполярных фрагментов в структуре фуллеренола: наименьшей токсичностью и наибольшей антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы, в структуре которых количество кислородосодержащих групп примерно в 2 раза меньше количества атомов углерода в каркасе фуллеренола;

**доказана** связь процессов ингибирования фуллеренолами бактериальной билюминесценции и их антиоксидантной активности с содержанием активных форм кислорода в бактериальных суспензиях и ферментативных системах.

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

(1) токсический эффект фуллеренолов связан со снижением содержания АФК, обусловленным избыточной антирадикальной активностью концентрированных растворов фуллеренолов и замедлением метаболических окислительных процессов, а также увеличением скорости автоокисления НАДН, приводящим к росту окислительной токсичности раствора; (2) антиоксидантный эффект фуллеренолов связан с гидрофильно-гидрофобными характеристиками компонентов системы, потреблением АФК бактериями, ускорением эндогенного окисления НАДН.

**Применительно к проблематике диссертации результативно использован**

комплексный подход: биолюминесцентный метод с использованием бактерий и их ферментативных систем – для оценки биологической активности веществ, хемилюминесцентный – для мониторинга содержания активных форм кислорода, спектрофотометрический – для контроля условий эксперимента и протекания НАДН-зависимых редокс-процессов;

**изложены** данные, свидетельствующие о том, что активация биолюминесценции бактерий в присутствии  $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ , где  $x+y = 40-42$ , сопровождается умеренным снижением количества АФК, что, вероятно, связано с усилением потребления АФК бактериями. Такой эффект фуллеренола объясняется высокой реакционной способностью, обусловленной его дипольной природой и высоким сродством к электрону;

**изучены** биоэффекты группы фуллеренолов с использованием биолюминесцентных тестовых систем: клеточной и ферментативной. Показано, что токсичность фуллеренолов наблюдается при высоких концентрациях, а антиоксидантная активность – при низких.

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

**определены** связи между структурными характеристиками фуллеренолов и параметрами их токсического и антиоксидантного действия, что формирует базу для подбора фуллеренолов с заданными характеристиками. Это позволит биологам и медикам снизить количество экспериментов на животных при изучении биологической активности препаратов, основанных на фуллеренолах;

**представлены** закономерности изменения биологической активности в зависимости от структурных характеристик фуллеренолов, обусловленных размером молекул, особенностью модификации поверхности, природы металла-заместителя и типа его включения.

**Оценка достоверности** результатов исследования выявила:

**для экспериментальных работ** результаты получены на сертифицированном оборудовании с применением современных биофизических методов

исследования, стандартных методик обработки результатов; показана воспроизводимость результатов; сформулированные в диссертации научные положения и выводы достоверны и полностью подтверждаются экспериментальными данными;

**теория** основывается на известных литературных данных о структурных особенностях фуллеренолов, их амфифильности и антирадикальной активности, о влиянии фуллеренолов на биологические процессы, что согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

**идея** базируется на фундаментальном подходе, в основе которого лежит связь структурных параметров соединений с элементарными физико-химическими процессами, которые в свою очередь определяют эффективность биохимических и клеточных процессов;

**использованы** авторские данные и данные, полученные и опубликованные другими исследователями, по рассматриваемой тематике;

**установлено** соответствие авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по биологической активности фуллеренолов;

**использованы** программы MS Office (Microsoft, США), GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Сан-Диего, США) для проведения статистической обработки и анализа полученных данных, а также построения графиков.

**Личный вклад соискателя** состоит в том, что все изложенные в диссертации результаты получены соискателем самостоятельно или при его непосредственном участии. Вклад состоял в анализе литературных данных, проведении научных экспериментов, обработке полученных результатов и их интерпретации, формулировании выводов, подготовке публикаций, а также представлении результатов работы на научных конференциях.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания

1. Что конкретно Вы понимаете под АФК? Что Вы добавляли для определения их содержания? Я не понимаю, как можно добавлять АФК?

2. Что Вы имеете в виду под механизмом действия антиоксидантов? Какие протекают реакции?

Соискатель Сушко Е.С. ответила на замечания:

1. Под АФК мы понимаем кислородсодержащие соединения, включающие нейтральные молекулы, радикалы, анион- и катион-радикалы и вступающие во взаимодействие с биологическими объектами. АФК мы в исследуемую систему не добавляли. Однако для определения интегрального содержания АФК в системе строили калибровочную кривую зависимости интенсивности хемилюминесценции люминола от концентрации пероксида водорода, который был использован в качестве модельного АФК.

2. В нашем случае антиоксидантное действие фуллеренолов изучали в условиях модельного окислительного стресса, при котором происходит снижение интенсивности биолюминесценции на 50%. Добавки фуллеренолов приводят к восстановлению интенсивности биолюминесценции, что рассматривается как биологический маркер антиоксидантного действия. Химический механизм, согласно представленному слайду, заключается во взаимодействии фуллеренолов с активными формами кислорода, приводящем к снижению их активности.

Диссертация Сушко Е.С. «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, удовлетворяющую требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года, № 1168 от 01 октября 2018 года и № 426 от 20 марта 2021 года.

На заседании 23 октября 2024 года диссертационный совет принял решение:

присудить Сушко Екатерине Сергеевне ученую степень кандидата

