



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)

Институт биофизики
Сибирского отделения Российской академии наук»
обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН
(ИБФ СО РАН)

Академгородок, д. 50, стр. 50, Красноярск, 660036
тел.: (391) 243-15-79, факс (391) 290-54-90
e-mail: ibp@ibp.ru; www.ibp.ru
ОКПО 03533441, ОГРН 1022402133698
ИНН/КПП 2463002263/246345004

УТВЕРЖДАЮ

Директор 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»

академик РАН, д.ф.-м.н., проф.
Дегерменджи Андрей Георгиевич

№ _____
на № _____ от _____



М.п.

«22» декабря 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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»

Диссертация «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем» 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».

В период подготовки диссертации соискатель Сушко Екатерина Сергеевна обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» и работала в должности младшего научного сотрудника в лаборатории фотобиологии Института 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 2017 г. Сушко Е.С. окончила магистратуру Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» по направлению подготовки 03.04.02. Физика.

С 01.10.2018 по 30.09.2022 г. Сушко Е.С. обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» по направлению 06.06.01. «Биологические науки».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2023 г. Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор Кудряшева Надежда Степановна, 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». Тема диссертации и научный руководитель утверждены приказом № 15800/33-АС от 28.11.2018 г., изменение темы диссертации утверждены приказом № 04-08/22-АС от 06.04.2022.

На семинаре присутствовали: к.б.н. Высоцкий Е.С.; к.б.н. Родионова Н.С. д.ф.-м.н., профессор Кудряшева Н.С.; к.ф.-м. н., доцент Немцева Е.В.; д. б.н. Бондарь В.С.; к.б.н. Петушков В.Н.; д.б.н. Франк Л.А.; к.б.н. Наташин П.В.; к.б.н. Ларионова М.Д.; к.б.н. Еремеева Е.В.; к.б.н. Красицкая В.В.; к.б.н. Башмакова Е.Е.; Пузырь А.П.; Колесник О.В.

Были заданы вопросы:

1. Нужно ли в заголовок писать «Биолюминесцентный мониторинг»?
2. На графике «Использование бактериальной тестовой системы для мониторинга эффектов фуллеренолов» есть участок концентраций, где $Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y=40-42$) стимулирует биолюминесценцию, а у

$Gd@C_{82}O_y(OH)_x$ ($x+y=20-24$) такого не наблюдается. Чем объясняется разница?

3. Активные формы кислорода участвуют в биолюминесценции?

4. Фуллеренолы сами синтезировали? рН измеряли? Точно ли у вас действует сам фуллеренол, а не примеси, которые остались после синтеза?

5. Раствор фуллеренолов – истинный? Частицы осаждаются? Центрифугировали?

6. Фуллеренолы – частицы или молекулы?

7. На 8 и 9 слайдах «Кинетики биолюминесцентной бактериальной и ферментативной тестовых систем в присутствии модельного окислителя и фуллеренола». Что означает «t»? Время или температура?

8. Антиоксидантные коэффициенты и цифры, указанные в выводах, на сколько точные?

9. Ваши данные коррелируют с данными, полученными ранее другими авторами? В чем уникальность вашей работы?

На все вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Сушко Е.С. «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика, посвящена изучению антиоксидантных и токсических свойств ряда водорастворимых производных фуллеренов в сопоставимых условиях, выявлению роли активных форм кислорода в этих процессах, установлению связи между структурными характеристиками водорастворимых производных фуллеренов (размером углеродного каркаса (C-60, C-70, C-82), количеством кислородных заместителей (10-12, 24-28, 40-42), включением экзо- или эндоэдрального атома металла) с характеристиками их биологической активности.

Личный вклад соискателя в получении научных результатов

Сушко Е.С. участвовала в планировании научных исследований, подборке реакционных смесей, условий экспериментов, обработке, интерпретации полученных результатов и их обсуждении (сопоставление полученных данных с литературными). Все экспериментальные исследования, включенные в диссертационную работу, выполнены лично либо при непосредственном участии автора. Результаты исследования были представлены лично автором в виде устных и стендовых докладов на

международных конференциях, автор также принимал основное участие в подготовке статей и тезисов к публикации.

Степень достоверности результатов

Сушко Е.С. изучена и проанализирована современная научная литература, сформулированные положения и выводы аргументированы и обоснованы результатами, полученными на основании большого экспериментального материала, и не противоречат известным положениям. Выводы соответствуют поставленным задачам и логически вытекают из полученных данных. В работе Сушко Е.С. использовалось современное научно-исследовательское оборудование и современные высокочувствительные, информативные физико-химические и биологические методы исследования, такие как спектрофотометрический, хемилюминесцентный и биолюминесцентные методы. Представленные автором данные достоверны, различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$).

Практическая значимость

1. Разработанные методы могут использоваться в экологии, фармакологии и медицине для определения антиоксидантной активности и токсических свойств биологически активных веществ.

2. Фундаментальные результаты исследований могут быть использованы в образовательном процессе студентов-медиков, фармакологов, биологов. Полученные результаты формируют теоретическую базу для выбора фуллеренолов с соответствующими токсическими и антиоксидантными характеристиками, что поможет биологам и медикам снизить количество экспериментов на животных.

Научная новизна

Работа направлена на изучение связи структурных характеристик фуллеренолов с их биологической активностью. Впервые были применены экспрессные биолюминесцентные тестовые системы различной сложности (биферментная система НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза; лиофилизированные и интактные бактерии *Photobacterium phosphoreum*) для оценки антиоксидантных и токсических свойств фуллеренолов разной структуры в сопоставимых условиях и выявления роли активных форм кислорода в данных процессах, что дает возможность прогнозировать свойства новых препаратов фуллеренолов, которые в настоящее время синтезируются в огромных количествах. Использование этих двух типов

систем позволило выявить и сравнить химические, биохимические процессы в биотестах различной сложности (на биохимическом и клеточном уровнях), ответственные за антиоксидантные и токсические эффекты фуллеренолов разного строения. Было выявлено, что:

1. Фуллеренолы ингибируют биолюминесценцию бактерий и ферментов при высоких концентрациях ($>10^{-3}$ г/л) и демонстрируют антиоксидантную активность при низких концентрациях ($<10^{-3}$ г/л).

2. В группах фуллеренолов с одинаковым каркасом, но разным количеством кислородсодержащих групп наименьшей ингибирующей способностью и наибольшей антиоксидантной активностью обладают фуллеренолы в структуре которых количество кислородсодержащих групп приблизительно равно $\frac{1}{2}$ количества атомов углерода фуллеренового каркаса, что связано с оптимальным соотношением полярных и неполярных фрагментов.

3. Фуллеренолы интенсивнее ингибируют биолюминесценцию бактериального биотеста, чем ферментативной системы, что объясняется наличием дополнительных путей воздействия на гидрофобные фрагменты бактериальной клеточной мембраны. Наименьшей токсичностью обладают Gd-содержащие фуллеренолы. Это связано с большим размером углеродного каркаса и склонностью к агрегации.

4. Ингибирующая способность и антиоксидантная активность сопровождаются уменьшением содержания АФК в суспензиях фуллеренолов.

5. Антиоксидантный эффект фуллеренолов зависит от амфифильных характеристик среды и максимален в растворах органического окислителя – 1,4-бензохинона.

6. Фуллеренолы ускоряют автоокисление НАДН в ферментативном и неферментативном процессах, а также окисление НАДН эндогенным окислителем ФМН в ферментативном процессе, что вносит вклад соответственно в уменьшение и увеличение скорости биолюминесцентной реакции.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы представлены на конференциях и других научных мероприятиях российского и международного уровня: VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, 2019); XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной Международному году Периодической таблицы химических элементов Д.И.

Менделеева. «Перспектив Свободный – 2019» (Красноярск, Россия, 2019); VI Съезде биофизиков России (Сочи, Россия, 2019); Международной конференции «VII Международная конференция по радиации в различных областях исследований (Конференция RAD 2019)» (Тиват, Черногория, 2019); 30-м ежегодном собрании европейского отделения Международного общества экологической токсикологии и химии окружающей среды (далее – SETAC Europe) (онлайн, 2020); 31-м ежегодном собрании европейского отделения SETAC Europe (онлайн, 2021); 10-ой встрече молодых ученых-экологов SETAC Europe (онлайн, 2021); XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (онлайн, 2021); Международной сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» (Красноярск, Россия, 2021); III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи-Дагомыс, Россия, 2021); XXVI Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых (ВНКСФ-26) (онлайн, 2022); XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (онлайн, 2022); Международной научно-практической конференции «Горная медицина и экстремальная экология человека» (санаторий «Иссык-Куль Аврора», Кыргызская Республика, 2022); Молодежной международной научной конференции «Современные тенденции развития функциональных материалов» (Адлер, Россия, 2022); Международной конференции молодых ученых ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXVI) (Красноярск, Россия, 2023); X Съезде Российского фотобиологического общества и Всероссийской конференции «Современные проблемы фотобиологии» (п. Шепси, Краснодарский край, Россия, 2023).

Результаты в полном объеме были изложены в статьях, опубликованных в специализированных рецензируемых международных журналах, что является подтверждением обоснованности полученных в работе результатов и сделанных выводов.

Основные результаты диссертации изложены в 38 печатных изданиях, в том числе: 7 статей в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus; 2 публикации в материалах конференций, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus; 5 публикаций в материалах конференций, индексируемых в базах данных РИНЦ; 24 публикации в материалах конференций, не индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, РИНЦ.

Статьи в международных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

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. Toxicity and Antioxidant Activity of Fullereneol $C_{60,70}$ with Low Number of Oxygen Substituents / E. S. Kovel (Sushko), A. G. Kicheeva, N. G. Vnukova, G. N. Churilov, E. A. Stepin, N. S. Kudryasheva // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — V. 22, №12. — P. 6382.

3. Kudryasheva, N. S. Monitoring of Low-Intensity Exposures via Luminescent Bioassays of Different Complexity: Cells, Enzyme Reactions, and Fluorescent Proteins / N. S. Kudryasheva, E. S. Kovel (Sushko) // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — V. 20, № 18. — P. 4451.

4. Kovel (Sushko), E. S. Antioxidant activity and toxicity of fullereneols 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.

5. Sachkova, A. S. Biological activity of carbonic nano-structures – comparison via enzymatic bioassay / A. S. Sachkova, E. S. Kovel (Sushko), G. N. Churilov, D. I. Stom, N. S. Kudryasheva // *Journal of Soils and Sediments*. — 2018. — V. 19, № 6. — P. 2689-2696.

6. Sachkova, A. S. On mechanism of antioxidant effect of fullereneols / 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.

7. Kudryasheva, N. S. Bioluminescent Enzymatic Assay as a Tool for Studying Antioxidant Activity and Toxicity of Bioactive Compounds / N. S. Kudryasheva, E. S. Kovel (Sushko), A. S. Sachkova, A. A. Vorobeva, V. G. Isakova, G. N. Churilov // *Photochemistry and Photobiology*. — 2017. — V. 93, № 2. — P. 536–540.

Публикации в материалах конференций, индексируемых в Web of Science, Scopus:

1. Sachkova, A. S. Antioxidant Activity of Fullereneols. Bioluminescent Monitoring in vitro / A. S. Sachkova, E. S. Kovel (Sushko), A. A. Vorobeva, N. S. Kudryasheva // *BIOSENSORS*. — 2017. — V. 27. — P. 230-231.

2. Tarasova, A. Use of bioluminescent enzyme system to detect antioxidant activity of fullereneol $C_{60}O_y(OH)_x$ / A. Tarasova, N. Kudryasheva, E. Kovel (Sushko), G. Churilov, N. Vnukova, V. Isakova, I. Osipova // *Luminescence*. — 2014. — V. 29 (S1). — P. 100-101.

Публикации в материалах конференций, индексируемых в РИНЦ:

1. Ковель (Сушко), Е. С. Токсичные, прооксидантные и антиоксидантные свойства наночастиц. Биолуминесцентный мониторинг in

vitro / Е. С. Ковель (Сушко), Л. С. Бондаренко, К. А. Кыдралиева, Г. И. Джардималиева, Э. Илия, Э. Томбач, А. С. Сачкова, Н. Г. Внукова, Г. Н. Чурилов, А. Г. Кичеева, Н. С. Кудряшева // Сборник материалов Международной сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» и XX Международного симпозиума «Сложные системы в экстремальных условиях» / Сибирский федеральный университет. — Красноярск, 2021. — С. 113-114.

2. Ковель (Сушко), Е. С. Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов. Билюминесцентный мониторинг / Е. С. Ковель (Сушко), Н. С. Кудряшева, А. С. Сачкова // Биофизика : сборник тезисов VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов / АНО «Иннов. Центр Кольцово». — Новосибирск, 2019. — С. 276-278.

3. Ковель (Сушко), Е. С. Токсичность и антиоксидантная активность фуллеренолов. Роль кислородосодержащих заместителей. Билюминесцентный мониторинг / Е. С. Ковель (Сушко), Н. С. Кудряшева, А. С. Сачкова // Действие физико-химических факторов на биологические системы : сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России. В 2 томах. Т. 2 / Полиграфическое объединение «Плехановец». — Краснодар, 2019. — С. 41.

4. Kudryasheva, N. S. Toxic and adaptive effects via luminescent assay of different complexity: bacterial cells, enzyme reactions, and fluorescent proteins / N. S. Kudryasheva, R. R. Alieva, T. V. Rozhko, A. S. Petrova, A. A. Lukonina, E. S. Kovel, A. S. Sachkova // Материалы XIX Всероссийского симпозиума с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях» / ФГБНУ «ФИЦ «КНЦ СО РАН». — Красноярск, 2018. — С. 124-126.

5. Kovel (Sushko), E. S. Use of bioluminescent assay systems to detect antioxidant activity of fullerenols / E. S. Kovel (Sushko), A. S. Sachkova, G. N. Churilov, N. S. Kudryasheva // Химия : Сборник научных трудов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук». В 7 томах. Т. 2 / Томский политехнический университет. — Томск 2016.— С. 217-219.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (далее – РФФИ), Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки № 20-44-243001 р_мол_а_Красноярск. «Анализ биологической активности фуллеренолов с использованием клеточных и ферментативных люминесцентных тестовых систем» (2021-2022, Руководитель); Отраслевой программы Роспотребнадзора (фундаментальные исследования) «Научные основы

гормезиса биологических, физических и химических факторов среды обитания с обоснованием системы оценки рисков» (2021-2023, Исполнитель); РФФИ №18-29-19003 мк. «Структурно-функциональные характеристики эндоэдральных фуллеренолов с Gd как основа их химической и биологической активности» (2018-2020, Исполнитель); Бюджетного проекта №0356-2018-0001 «Программа фундаментальных исследований РАН № 32» Наноструктуры: физика, химия, биология. Основы технологии» (тема: «Токсические и антиоксидантные свойства углеродных наноструктур-фуллеренолов») (2018-2020, Исполнитель).

Диссертация «Токсические и антиоксидантные свойства фуллеренолов. Изучение с помощью биолюминесцентных тестовых систем» Сушко Екатерины Сергеевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на биолюминесцентном семинаре 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».

Присутствовало на заседании 14 чел. Результаты голосования: «за» – 14 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 42 от «22» декабря 2023 г.

Заместитель председателя биолюминесцентного семинара, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией фотобиологии Института биофизики СО РАН



Высоцкий
Евгений
Степанович

Секретарь биолюминесцентного семинара, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН



Родионова
Наталья
Сергеевна