

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.072.14 НА  
БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 13.12.2018 г. № 4

О присуждении Владимирову Георгию Константиновичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении» по специальности 03.01.02 – биофизика принята к защите 11.10.2018 г. протокол № 5 диссертационным советом Д 208.072.14 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (приказ 1135/нк от 23.09.2015.), адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

Соискатель Владимиров Георгий Константинович, 1992 года рождения, окончил фармацевтический факультет Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Фармация».

В период подготовки диссертации являлся очным аспирантом на кафедре медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» на кафедре медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины.

Научный руководитель:

Владимиров Юрий Андреевич - доктор биологических наук, академик РАН, профессор, заведующий кафедрой медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Ланкин Вадим Зиновьевич – доктор биологических наук, профессор, и.о.руководителя, главный научный сотрудник отдела биохимии свободнорадикальных процессов Научно-исследовательского института клинической кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Иванов Алексей Сергеевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией межмолекулярных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, в своем положительном заключении, подписанным Пальминой Надеждой Павловной, доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (протокол № 5 от 28.11.2018г.), указала, что диссертационная работа Владимирова Георгия Константиновича «Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является законченным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, выполненным под руководством академика РАН, профессора Владимирова Юрия Андреевича, результаты которого имеют существенное значение для современной биофизики. В исследовании Владимирова Георгия Константиновича решена важная научная задача — охарактеризован комплекс цитохрома с с кардиолипином: получены данные о его размере, химическом составе, конформации белка в комплексе и о механизме образования им свободных радикалов в гидрофобном окружении.

В работе имеются следующие недостатки:

- В обзоре литературы не нашли отражения работы по перекисному окислению липидов в биологических мембранах, выполненные под руководством профессора Бурлаковой Е.Б., а также группы В.Е.Кагана по математическому моделированию структуры комплекса цитохрома с с кардиолипином;

- В главе «Результаты», не стоило отдельно выделять раздел *«Изучение механизма цитотоксического действия комплекса Цит-КЛ на раковые клетки»*, так как сам диссертант не проводил экспериментов по действию комплекса на раковые клетки, это делали соавторы его работы. В основе объяснения цитотоксического действия лежат результаты, полученные

диссертантом методом хемилюминесценции, их лучше было бы объединить в разделе *«Образование липопероксильных радикалов в реакциях, катализируемых комплексом Цит-КЛ»*;

- В опытах с митохондриями не было отдельно изучено взаимодействие комплекса Цит-КЛ с наружной и внутренней мембранами, а изучалось взаимодействие с суспензией, содержащей обе митохондриальные мембраны.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Владимиров Георгий Константиновича соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Владимиров Георгий Константинович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — Биофизика.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ по теме диссертации, в том числе 2 научных статьи в рецензируемых отечественных журналах, включенных в перечень ВАК, 2 статьи в рецензируемых зарубежных журналах и 2 тезисов докладов конференций. Публикации посвящены вопросам структуры и функционирования в клетке белок-липидного комплекса цитохрома с кардиолипином. Проведение всех экспериментов, за исключением экспериментов на раковых клетках, обработка и интерпретация всех полученных данных, и написание статей осуществлены лично соискателем. Общий объем публикаций составил 2,7 печатных листов и содержит 82% авторского вклада.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1) Structure of the complex of cytochrome c with cardiolipin in non-polar environment / G. K. Vladimirov, A. S. Vikulina, D. Volodkin,

Y. A. Vladimirov // *Chemistry and Physics of Lipids*. — 2018. — Vol. 214. — P. 35–45.

2) The cytotoxic action of cytochrome c/cardiolipin nanocomplex (cyt-cl) on cancer cells in culture / Y. A. Vladimirov, S. Can, G. K. Vladimirov et al. // *Pharmaceutical Research*. — 2017. — Vol. 34, no. 6. — P. 1264–1275

На автореферат поступили отзывы от:

✓ Андрианова Александра Михайловича – доктора химических наук, кандидата биологических наук, главного научного сотрудника Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности представленного исследования, научной новизны и практической значимости полученных результатов. Отмечается, что диссертационная работа выполнена на высоком квалификационном научном уровне и соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

✓ Волкова Владимира Владимировича – доктора химических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории рефлектотрии и малоуглового рассеяния Института Кристаллографии им А.В. Шубникова РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности представленного исследования, научной новизны и практической значимости полученных результатов. Отмечается, что все полученные данные являются новыми и интересными, хорошо дополняют и согласуются друг с другом, и что диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

✓ Красновского Александра Александровича – доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности представленного исследования, научной новизны и практической значимости полученных результатов. Отмечается, что автор хорошо ориентируется в огромном объеме литературной информации по проблемам, освещенным в работе, проявляет склонность к обобщению своих и литературных данных, что делает полученные результаты доступными для понимания не только узкими специалистами, но и более широкому кругу исследователей. Также отмечается, что диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

✓ Курченко Владимира Петровича – кандидата биологических наук, заведующего НИЛ прикладных проблем биологии Белорусского Государственного Университета

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности представленного исследования, научной новизны и практической значимости полученных результатов. Отмечается, что при выполнении работы автором применен большой арсенал современных методов исследования, что свидетельствует о высоком уровне подготовки диссертанта. Также отмечается, что диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Шадыро Олега Иосифовича – доктора химических наук, профессора, заведующего кафедрой радиационной химии и химико-фармацевтических технологий Белорусского Государственного Университета.

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности представленного исследования, научной новизны и практической значимости полученных результатов. Отмечается, что полученные в результате выполнения работы фундаментальные знания раскрывают перспективу создания стратегии лечения и получения препаратов на основе белок-липидных комплексов для

борьбы с онкологическими заболеваниями. Также отмечается, что диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Фалетрова Ярослава Вячеславовича – кандидата химических наук, доцента, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии лекарственных препаратов НИИ Физико-химических проблем Белорусского Государственного Университета и Шкуматова Владимира Макаровича, – доктора биологических наук, член-корреспондента НАН Беларуси, профессора, заведующего лабораторией биохимии лекарственных препаратов НИИ Физико-химических проблем Белорусского Государственного Университета.

Отзыв на автореферат содержит оценку актуальности представленного исследования, научной новизны и практической значимости полученных результатов. Отмечается, что для решения задач работы использованы современные методы биологических исследований, а результаты работы опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах. Также отмечается, что диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Отзыв положительный, критических замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов обосновывается наличием публикаций по тематике представленной к защите диссертации в рецензируемых журналах, выбор ведущей организации – широко известными достижениями в области изучения свободнорадикальных процессов с участием липидов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- отработаны условия получения и методы изучения строения пероксидазной активности комплекса цитохрома с с кардиолипином (Цит-КЛ) в неполярной среде.

- исследованы размеры наносфер комплекса и соотношение липид/белок в комплексах Цит-КЛ в неполярном окружении (гидрофобных растворителях). Частицы комплекса Цит-КЛ в неполярном окружении имеют размер  $7,8 \pm 1,0$  (при соотношении липид/белок, равном 13) и  $12,1 \pm 1,4$  нм (при соотношении липид/белок, равном 59). Сопоставление этих данных со строением Цит-КЛ в микрокристаллических осадках и разбавленных водных растворах, выявило, что размеры частиц Цит-КЛ в неполярном окружении совпадают с размерами этих частиц в микрокристаллическом осадке, а соотношение липид/белок в Цит-КЛ, помещенном в неполярную среду, соответствует аналогичному соотношению в разбавленных водных растворах Цит-КЛ с точностью до ошибки измерения.

- при исследовании изменения конформации цитохрома с при переходе из водного раствора в комплекс Цит-КЛ и в водно-метанольный раствор выявлено, что конформация ЦитС, входящего в состав Цит-КЛ, помещенного в неполярное окружение, отличается от нативной: разрушены железосерные связи между гемовым железом и серой метионина Met80 (исчезает поглощение при 699 нм) и увеличено расстояние от гема до остатков тирозина и триптофана (появляется флуоресценция при 307-310 и 330 нм). Конформация ЦитС, помещенного в водно-метанольную среду, изменена таким же образом. Это говорит о том, что в данном случае структурные изменения – это частичное плавление глобулы. Оно обратимо, о чем говорят данные по поглощению при 699 нм в системе метанол-цитохром.

- исследована возможность изучения образования свободных радикалов в липопероксидазных реакциях, катализируемых комплексом Цит-КЛ, методом хемилюминесценции, активированной изохинолизиновыми кумариновыми красителями С-525 и С-334. Обнаружено, что кумариновые активаторы хемилюминесценции (С-525, С-314 и С-334), ранее используемые при исследованиях образования пероксильных радикалов в мембранных системах, разрушаются в ходе пероксидазной реакции, катализируемой комплексом Цит-КЛ, при этом данный процесс не сопровождается

хемилюминесценцией. Обнаружено также, что за время измерения кинетических кривых хемилюминесценции происходит разрушение не более 29% С-334, 48% С-525 и 39% С-314. Таким образом, выводы об образовании свободных радикалов и о механизме реакций, полученные при анализе кинетики хемилюминесценции, могут быть сделаны без внесения поправок на частичное разрушение участников реакции реагентов.

- путем регистрации кинетики хемилюминесценции в присутствии активаторов С-334 и С-525 изучено образование свободных радикалов в липопероксидазных реакциях, катализируемых комплексом Цит-КЛ, методом активированной кумаринами хемилюминесценции в среде, состоящей из гидрофобного растворителя. Обнаружено образование липопероксильных радикалов при окислении природного кардиолипина в водных растворах и в неполярных растворителях, катализируемое комплексом Цит-КЛ. Показано, что радикалы образуются в двух реакциях – разложение гидропероксидов липидов и пероксидация кардиолипина в присутствии  $H_2O_2$  (квази-липоксигеназная и липопероксидазная реакции). Антиоксиданты тролокс и дигидрокверцетин угнетали образование радикалов в липопероксидазной реакции в концентрациях порядка десятой доли мкМ.

- установлено, что реакция липидной пероксидации протекает при действии комплекса Цит-КЛ на изолированные митохондрии, преимущественно на внутренние мембраны, о чем говорит факт интенсивной хемилюминесценции суспензии шокированных митохондрий в присутствии Цит-КЛ и пероксида водорода

- в совокупности показано, что механизм обнаруженного в совместной работе с нашим участием апоптотического и цитотоксического действия Цит-КЛ на раковые клетки может включать в себя катализ липидной пероксидации в мембранах митохондрий, который приводит к образованию липопероксильных радикалов в квази-липоксигеназной и липопероксидазных реакциях. Была разработана схема последовательных процессов в клетке,

заканчивающаяся их гибелью. Эти данные могут послужить началом создания нового типа лекарственных препаратов, которые, будучи элементами самой клетки, оказывают действие на раковые клетки, нечувствительные к синтетическим препаратам.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что данные, полученные в результате проведенных исследований, позволяют раскрыть механизм апоптогенного и цитотоксического действия комплекса Цит-КЛ на раковые клетки в культуре.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: полученные знания позволяют в дальнейшем производить поиск противораковых агентов нового типа – белково-липидных комплексов с пероксидазной активностью.

Результаты диссертационной работы внедрены в научно-исследовательскую и образовательную деятельность на факультете фундаментальной медицины Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, в частности в циклы лекций по дисциплине медицинская биофизика.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: количественную и качественную сопоставимость результатов, полученных автором в ходе исследования, с результатами последних публикаций других авторов, выполненных по схожей тематике; результаты, приведенные соискателем, получены с использованием современных биофизических и молекулярно-биологических методов исследования, характеризуются высокой степенью воспроизводимости; выводы аргументированы, научно обоснованы и являются прямым следствием результатов проведенных автором исследований. Оригинальность работы согласно системе «Антиплагиат» составляет 95,5%.

Личный вклад соискателя состоит в проведении всех экспериментов, результаты которых представлены в диссертационной работе, за

исключением экспериментов на раковых клетках. Лично автором были проведены обработка и интерпретация всех полученных данных.

Диссертация Владимиров Георгия Константиновича представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013г.(в редакции Постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016г. с изменениями Постановления Правительства РФ №748 от 02.08.2016г.), в ней отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты, в диссертации отсутствует заимствованный материал без ссылки на автора и (или) источник заимствования.

На заседании 13 декабря 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Владимирову Георгию Константиновичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 8 докторов наук по специальности 03.01.02 – биофизика, участвовавших в заседании, из 32 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени - 18, против присуждения ученой степени – 2, недействительных бюллетеней – 2.

Председатель

диссертационного совета

д.б.н., профессор



Кузнецов Дмитрий Анатольевич

Учёный секретарь

диссертационного совета

д.м.н., профессор



Кягова Алла Анатольевна

17.12.2018г.



ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ  
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ ФГБОУ ВО ВРНИУ  
К. Н. И. ПИРГОВА МИНЗДРАВА РОССИИ  
17 12 20 18г.