

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

На базе Федерального по диссертации государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 04 октября 2017 г. № 19

О присуждении **Злобовской Ольге Анатольевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Методы светозависимой активации и детекции клеточной гибели с помощью флуоресцентных белков» по специальности 03.01.03 (молекулярная биология) принята к защите 28 июня 2017 г., протокол № 17 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; Приказ Минобрнауки России от 15 февраля 2013 г. №75/нк).

Соискатель Злобовская Ольга Анатольевна 1990 года рождения.

В 2012 году соискатель окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. С 2012 г. по 2016 г. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. С 2012 по 2015 гг. работала в должности старшего лаборанта с высшим профессиональным образованием, а с 2015 г. по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в лаборатории

биофотоники.

Научный руководитель – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук Лукьянов Константин Анатольевич, руководитель лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Кантидзе Омар Леванович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурно-функциональной организации хромосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

2. Туроверов Константин Константинович, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук, г. Пущино, в своем положительном заключении, подписанном Колбом Вячеславом Адамовичем, доктором биологических наук, директором института, и утвержденном заместителем директора, кандидатом химических наук Никулиным Алексеем Донатовичем, указала, что полученные автором результаты обладают несомненной значимостью для науки, работа соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", а Злобовская Ольга Анатольевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Соискатель имеет 5 работ по теме диссертации объемом 4,3 печатных листа, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, входящих в базу Web of Science, а также 1 патент РФ. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах. Наиболее

значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. Sergeeva TF, Shirmanova MV, **Zlobovskaya OA**, Gavrina AI, Dudenkova VV, Lukina MM, Lukyanov KA, Zagaynova EV (2017) Relationship between intracellular pH, metabolic co-factors and caspase-3 activation in cancer cells during apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1864(3):604-611.
2. Ryumina AP, Serebrovskaya EO, Staroverov DB, **Zlobovskaya OA**, Shcheglov AS, Lukyanov SA, Lukyanov KA (2016) Lysosome-associated miniSOG as a photosensitizer for mammalian cells. *Biotechniques* 61(2):92-4.
3. **Zlobovskaya OA**, Sergeeva TF, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Sharonov GV, Zagaynova EV, Lukyanov KA (2016) Genetically encoded far-red fluorescent sensors for caspase-3 activity. *Biotechniques* 60(2):62-8.
4. Sarkisyan KS, **Zlobovskaya OA**, Gorbachev DA, Bozhanova NG, Sharonov GV, Staroverov DB, Egorov ES, Ryabova AV, Solntsev KM, Mishin AS, Lukyanov KA (2015) KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated by Blue and Green Light. *PLoS One* 10(12):e0145287.
5. **Злобовская ОА**, Саркисян КС, Лукьянов КА (2015) Инфракрасный флуоресцентный белок iRFP как акцептор для резонансного переноса энергии возбуждения. *Биоорганическая Химия*, том 41, № 3, с. 299–304

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Кантидзе Омара Левановича, отзыв положительный, содержит следующие замечания:
  - Для анализа цитотоксического действия KillerOrange автор использует цитофлуориметрический анализ клеток, подвергнутых действию активирующего света и проинкубированных затем в течение более чем 24 часов. В качестве внутреннего контроля использовали клетки, экспрессирующие EGFP. В таком случае, есть определенная вероятность, что разница (особенно небольшая) в количестве клеток, экспрессирующих фотосенсибилизаторы и нетоксичные флуоресцентные белки, будет обусловлена не светозависимой гибелью клеток, а тем, что повреждения, вносимые фотосенсибилизаторами, приводят к транзientной остановке клеточного цикла.
  - Не всегда продуманное оформление и крайне лаконичные подписи к рисункам. Так, например, подписи к рисункам 35 и 38 не дают никакого представления о том, какие экспериментальные точки анализировались, что обозначают подписи осей диаграмм (рис. 35). Подписи к рисункам, на которых представлены

микрофотографии клеток (например, 37, 42, 43, 46), не содержат информации об условиях возбуждения флуоресценции, что может быть важно, например, в случае данных, представленных на рисунках 42-43. Не всегда удачен и выбор микрофотографий. Например, на рисунке 45 представлен анализ локализации белка Вах - автором отмечены временные точки начала транслокации этого белка из цитоплазмы в митохондрии, однако, по представленным микрофотографиям не очевидно, когда эта транслокация действительно начинается (и происходит ли вообще).

2. Отзыв официального оппонента Туроверова Константина Константиновича, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

– К недостатку работы можно отнести не слишком хорошее изложение материала. Встречается много неудачных фраз. Конечно, во всех случаях, можно понять, о чем идет речь, но лучше стараться излагать материал литературным русским языком. Впрочем, эти замечания касаются, в основном, оформления диссертации и изложения материала и не ставят под сомнение научные результаты, полученные в работе.

3. Отзыв ведущей организации, составленный Колбом Вячеславом Адамовичем. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

– Замеченные недостатки диссертации Злобовской легко поправимы с помощью редакторской правки. Так, в русском отсутствует глагол «мониторить» (см. с. 74), и его употребления следовало бы избегать. Также глагол «разводить» (с. 65 и 87) не полностью синонимичен глаголу «разбавлять» (особенно в современном русском), и автору следовало бы использовать именно второй вариант этого слова. Также в тексте Злобовской нашлась и терминологическая вольность: «клеточные тельца» (с. 86) использованы вместо «телец включения» (inclusion bodies). Вообще же в тексте совсем немного опечаток и нет грамматических ошибок, хотя стилистические изредка встречаются. Чуть более существенным недостатком представляется запаздывание с расшифровкой аббревиатур: появившаяся на пятой странице аббревиатура CALI расшифровывается только на 28-ой странице. Разумеется, эти небольшие огрехи не мешают восприятию текста и совершенно не снижают

качества полученных результатов.

– Несколько разочаровывает неупоминание в выводах диссертации обнаруженного отсутствия корреляции по времени между активацией каспазы и миграцией белка Вах в митохондрии, а также закислением цитоплазмы. Это немного обедняет выводы. Вероятно, осторожность и требовательность автора диссертации к всесторонним контролям помешали включить обнаруженное явление в выводы работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих тематике диссертации, а именно в молекулярной биологии, в области изучения и применения флуоресцентных белков, в том числе дальнекрасных и ближнеинфракрасных, а также фототоксических флуоресцентных белков, что подтверждается наличием у них большого количества публикаций по данным темам в высокорейтинговых российских и зарубежных научных журналах. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научное и практическое значение представленной диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был создан инструмент для изучения такого механизма клеточной гибели, как апоптоз. Это дальнекрасный-ближнеинфракрасный генетически кодируемый сенсор активности каспазы-3 mKate2-DEVD-iRFP, в состав которого впервые был введен флуоресцентный белок на основе бактериофитохрома iRFP. Также была продемонстрирована возможность его применения для многоцветной флуоресцентной микроскопии. Кроме того, Злобовской О.А. был охарактеризован фототоксический эффект флуоресцентных белков семейства KillerRed: KillerOrange, SuperNova и SuperNova-2 в клетках млекопитающих.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в работе был успешно применен метод создания генетически кодируемых сенсоров на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии. С помощью сенсора на активность каспазы-3 были выявлены несоответствия текущему научному мнению относительно последовательности молекулярных событий в сигнальных каскадах в процессе апоптоза. Практическая значимость

заключается в создании перспективных молекулярных инструментов для молекулярной и клеточной биологии и биомедицинских исследований, в частности, для 1) прицельного свето-зависимого уничтожения целевых клеточных популяций, 2) технологии хромофор-опосредованной свето-зависимой инактивации целевых белков, 3) анализа механизмов цитотоксичности медицинских препаратов, направленных на уничтожение клеточных популяций.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что эксперименты были проведены на передовом методическом уровне, а инструменты для детекции активности каспазы-3 и для достижения фототоксического эффекта, разработанные соискателем, прошли независимую экспериментальную проверку в других лабораториях, в том числе зарубежных.

Личный вклад соискателя состоит в активном участии на всех этапах процесса: планировании и проведении экспериментов, анализе полученных данных и подготовке результатов к публикации в научных журналах. Все экспериментальные данные получены лично автором.

На заседании 04 октября 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Злобовской Ольге Анатольевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 7 докторов наук (по специальности диссертации 03.01.03 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель  
диссертационного совета

Ученый секретарь  
диссертационного совета



академик РАН В.Т. Иванов

д.ф.-м.н. В.А. Олейников