

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл.,
проспект Науки, д.3.

Тел./факс: (4967)73-26-36,

e-mail: info@pncbi.ru, <https://www.pbcras.ru>

ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983,

ИНН/КПП 5039002841/503901001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

д.ф.-м.н. Грабарник П.Я.



04 октября 2024. № 191-01-2115/682
На № _____ от _____

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный
исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»**

Диссертация «Исследование динамики митохондриальной сети в моделях клеточного стресса» выполнена в лаборатории клеточных механизмов нейропатологий Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Крицкая Кристина Андреевна в 2018 г. с отличием окончила бакалавриат Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный университет» по специальности 06.03.01 «Биология». В 2020 г. Крицкая К. А. окончила с отличием магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пушкинский государственный естественно-научного институт» по специальности 06.04.01 «Биология». С 2020 по 2024 гг. соискатель обучалась в очной аспирантуре Российской академии наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

Справка о сданных кандидатских экзаменах выдана в 2024 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

В период подготовки диссертации с 2020 по 2022 гг. Крицкая К.А. работала в лаборатории внутриклеточной сигнализации ФИЦ ПНЦБИ РАН в должности инженера-исследователя, а с 2022 и по настоящее время Крицкая К.А. работает в лаборатории клеточных механизмов нейропатологий ФИЦ ПНЦБИ РАН в должности младшего научного сотрудника.

Научный руководитель – Бережнов Алексей Валерьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных механизмов нейропатологий ФИЦ ПНЦБИ РАН.

По итогам рассмотрения диссертации «Исследование динамики митохондриальной сети в моделях клеточного стресса» принято следующее **заключение**:

Диссертация Крицкой Кристины Андреевны является законченной научно-квалификационной работой, которая посвящена изучению динамики митохондриальной сети при патологических состояниях, а также способам коррекции динамики митохондриальной сети для улучшения выживаемости клеток в условиях стресса. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, результаты, представленные в диссертации, в полном объеме отражены в публикациях в рецензируемых научных изданиях. Разработанный в работе подход, основанный на автоматическом анализе конфокальных изображений и представлении митохондриальной сети в виде графа, позволил выявить и более детально охарактеризовать морфологические особенности митохондриальной сети при различных патологических состояниях, включая мутации, связанные с болезнью Паркинсона, окислительный стресс, ингибирование дыхания, голод, нарушения деления митохондрий, а также показать влияние ряда потенциальных защитных агентов на динамику митохондриальной сети, что открывает перспективы для разработки новых терапевтических подходов для защиты клеток в условиях стресса.

Результаты, полученные в диссертации Крицкой К. А., актуальны как для прикладных, так и фундаментальных исследований в области клеточной биологии, связанной с митохондриями, анализом морфологии митохондриальной сети и пониманием роли нарушений динамики митохондриальной сети в гибели клетки в условиях стресса.

Актуальность темы

Митохондрии играют ключевую роль в жизнедеятельности клеток, участвуя в энергетическом обмене, регуляции клеточной гибели, пролиферации и метаболизме. Особый интерес представляет динамическая структура митохондрий – митохондриальная сеть, морфология которой адаптируется к различным факторам. Растущий объем научных данных указывает на критическую роль митохондриальной сети в поддержании клеточного гомеостаза, особенно в тканях с высокой метаболической активностью. Нарушения в динамике митохондриальной сети ассоциированы с широким спектром патологий, включая нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и метаболические заболевания. Это открывает перспективы для разработки новых подходов, направленных на коррекцию динамики митохондриальной сети, а также использования морфологии митохондриальной сети в качестве потенциального биомаркера заболеваний. Несмотря на возросший интерес к изучению динамики митохондриальной сети, существует ряд нерешенных проблем: отсутствие четко установленных особенностей морфологии митохондриальной сети при различных патологиях, необходимость усовершенствования методов количественной оценки митохондриальной сети, недостаток данных о влиянии защитных воздействий на динамику митохондриальной сети и потребность в идентификации новых агентов для ее коррекции. Таким образом, исследование динамики митохондриальной сети при патологических состояниях, а также поиск способов ее фармакологической коррекции представляет собой актуальную и перспективную задачу современной биомедицины.

Научная новизна

В настоящей работе усовершенствован подход автоматического анализа динамики митохондриальной сети на основе представления сети в виде графа, а также морфологических параметров, что позволило выявить особенности морфологии митохондриальной сети клетки при окислительном стрессе, мутациях, связанных с

болезнью Паркинсона, ингибировании дыхания, нарушении митохондриального деления, снижении pH. В работе также впервые установлено, что в клетках нейрон-глиальной культуры, фибробластах кожи и клетках рака молочной железы индукция апоптоза происходит при различной доле деполяризованных митохондрий, что связано, в том числе, с относительной экспрессией проапоптатических и антиапоптатических факторов. Впервые получены данные о влиянии мутаций, ассоциированных с наследственной формой болезни Паркинсона, на морфологию митохондриальной сети в фибробластах в нормальных условиях и при действии окислительного стресса, а также выявлена связь этих мутаций с продукцией активных форм кислорода. Впервые определено влияние на динамику митохондриальной сети потенциальных защитных агентов, таких как: экзогенный рекомбинантный белок теплового шока 70 и его С-концевой фрагмент, активатор Nrf-2 пути – омавелоксолон, лактат и пируват натрия. Показано, что применение этих агентов может повышать выживаемость клеток и нормализовать динамику митохондриальной сети в условиях стресса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении представлений о механизмах изменения динамики митохондриальных сетей под влиянием различных факторов, включая клеточный стресс, нарушение процессов митохондриального деления, генетические мутации, ассоциированные с болезнью Паркинсона, и колебаний pH внеклеточного пространства. С практической точки зрения, был разработан новый подход для анализа морфологии митохондриальной сети в клетках млекопитающих, а также определено воздействие потенциальных защитных агентов на морфологию и динамику митохондриальной сети: рекомбинантного белка теплового шока 70 и его С-концевого фрагмента, активатора Nrf-2 пути – омавелоксолон, лактата и пирувата натрия. Полученные результаты создают основу для разработки новых терапевтических подходов к лечению заболеваний, в патогенезе которых важную роль играют нарушения динамики митохондриальной сети и митохондриальной дисфункции.

Связь темы с планом основных научных работ учреждения

Результаты, представленные в работе, получены при выполнении государственного задания ФИЦ ПНЦБИ РАН № 075-01512-22-02/004-00 по теме: «Нейропротекторные препараты нового поколения» № 1022080100047-5-1.6.4. Часть работы выполнена при поддержке гранта РНФ 22-24-01043 «Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни Паркинсона» (2022-2023) и гранта РФФИ 20-34-70074 «Роль окислительного стресса в нейродегенерации».

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Крицкая Кристина Андреевна принимала непосредственное участие на всех этапах работы над диссертацией: при планировании работы, постановки целей и задач исследования, выборе методов исследования, написании программного кода для анализа митохондриальной сети, проведении экспериментов, обработке и анализе данных, подготовке статей к публикации и представлении результатов на конференциях.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации

Все изложенные в диссертации Крицкой К.А. данные доложены на международных и отечественных конференциях и опубликованы в научных журналах, которые входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Достоверность изложенных в диссертации данных не вызывает сомнения. Научные положения и выводы, представленные в работе, опираются на теоретический анализ и экспериментальные данные. Для достижения целей исследования использованы

адекватные современные подходы и прецизионное оборудование. Предоставленные результаты статистически обработаны с использованием современных методов и статистического компьютерного анализа и характеризуются воспроизводимостью и статистической значимостью.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени

Материалы диссертации в полном объеме отражены в публикациях Крицкой К. А.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендована к защите

Диссертационная работа Крицкой К. А. соответствует пункту 2 (изучение клеточных органелл – митохондрий), пункту 13 (изучение клеточной гибели), пункту 18 (изучение клеток многоклеточных организмов в норме и патологии) и 22 (разработка и применение новых экспериментальных методов цифрового анализа изображений клетки) Паспорта научной специальности 1.5.22. – Клеточная биология (биологические науки).

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: «Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – Наука XXI Века», (г. Пушкино, 2024 г.); «VII Съезд биофизиков России», (г. Краснодар, 2023 г.); Всероссийская конференция «Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине» (г. Орел, 2023 г.); Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пушкино, 2023 г.); «RusNeurochem 2022 Всероссийская с международным участием конференция Российского нейробиологического общества» (г. Санкт-Петербург, 2022 г.); Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (г. Пушкино, 2021 г.); 45th FEBS Congress, «Molecules of life: Towards new horizons» (Online, 2021 г.).

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах (квартиль Q1), входящих в перечень рекомендованных ВАК для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и 22 публикации в сборниках конференций и тезисах докладов.

Статьи в журналах

1. **К. А. Kritskaya**, E. I. Fedotova, A. V. Berezhnov Impaired Mitochondrial Network Morphology and Reactive Oxygen Species Production in Fibroblasts from Parkinson's Disease Patients // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12, No. 2. – DOI 10.3390/biomedicines12020282.
2. A. Y. Vinokurov, A. A. Palalov, **K. A. Kritskaya** [et al.] Cell-Permeable HSP70 Protects Neurons and Astrocytes Against Cell Death in the Rotenone-Induced and Familial Models of Parkinson's Disease // *Molecular Neurobiology*. – 2024. – DOI 10.1007/s12035-024-04077-9.
3. "One Small Step for Mouse": High CO₂ Inhalation as a New Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease / A. D. Nadeev, **K. A. Kritskaya**, E. I. Fedotova, A. V. Berezhnov // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, No. 11. – P. 2832. – DOI 10.3390/biomedicines10112832.

Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

1. Крицкая, К. А. Внутриклеточное закисление активирует митофагию и модулирует митохондриальную динамику в моделях болезни Паркинсона / К. А. Крицкая, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Биология - наука XXI века : Сборник тезисов 27-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием, Пушкино, 22–25 апреля 2024 года. – Пушкино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

- "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", 2024. – С. 42. – EDN XAFIQK.
2. Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни Паркинсона / А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. Д. Надеев // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции, Минск, 25–27 июня 2024 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2024. – С. 106. – EDN MTVRYR.
3. Защитные эффекты закисления внутриклеточной среды в MPP+-индуцированной клеточной модели болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. Д. Надеев, А. В. Бережнов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции, Минск, 25–27 июня 2024 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2024. – С. 166. – EDN IOEUJO.
4. Активаторы митофагии как потенциальные нейропротекторы при болезни Паркинсона / А. Д. Надеев, Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. В. Бережнов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тезисы докладов 16-й Международной научной конференции, Минск, 25–27 июня 2024 года. – Минск: Белорусский государственный университет, 2024. – С. 224. – EDN SFWJQX.
5. Нарушения митохондриальной динамики при нейродегенерации / А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. Д. Надеев // Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине: сборник трудов Всероссийской конференции, Орёл, 16–17 ноября 2023 года. – Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2023. – С. 11. – EDN FLJQBK.
6. Изучение митохондриальной сети при болезни Паркинсона / К. А. Крицкая, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине: сборник трудов Всероссийской конференции, Орёл, 16–17 ноября 2023 года. – Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2023. – С. 17. – EDN SRGGDW.
7. Оценка клеточных нарушений в моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. В. Бережнов // Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине: сборник трудов Всероссийской конференции, Орёл, 16–17 ноября 2023 года. – Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2023. – С. 30. – EDN HQIQHL.
8. Вспышки мембранного потенциала митохондрий при стрессе в фибробластах с мутацией, связанной с болезнью Паркинсона / К. А. Крицкая, Е. И. Федотова, Д. П. Ларюшкин, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сборник статей, Пушкино, 22–26 мая 2023 года. – Пушкино: Федеральное государственное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", 2023. – С. 345-347. – EDN REYNJH.
9. Федотова, Е. И. Защитное влияние закисления внутриклеточной среды в токсических клеточных моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. В. Бережнов // VII Съезд биофизиков России: Сборник научных трудов. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. Том 2. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 173-174. – EDN SKEDEL.
10. Митохондриальная мегапора (mPTP) и процесс клеточной гибели / К. А. Крицкая, О. А. Стельмашук, А. В. Бережнов, А. Ю. Абрамов // VII Съезд биофизиков России: Сборник научных трудов. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. Том 2. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 222. – EDN YEWJBL.

11. Нейропротекторный потенциал закисления внутриклеточной среды в токсической модели болезни Паркинсона / А. Д. Надеев, К. А. Крицкая, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // VII Съезд биофизиков России: Сборник научных трудов. В 2-х томах, Краснодар, 17–23 апреля 2023 года. Том 2. – Краснодар: Кубанский государственный технологический университет, 2023. – С. 229. – EDN NCIETV.
12. Федотова, Е. И. Нарушения в культуре фибробластов с мутациями, связанными с развитием болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : Сборник статей Международной конференции, Пущино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 595-600. – EDN JWFUBL.
13. Федотова, Е. И. Влияние закисления внутриклеточной среды в токсической клеточной модели болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация : Сборник статей Международной конференции, Пущино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 600-607. – EDN IXMFHD.
14. Пилотное исследование: анализ митохондриальной сети при помощи топологического анализа данных / К. А. Крицкая, А. В. Бережнов, Е. И. Федотова, Д. П. Ларюшкин // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей Международной конференции, Пущино, 22–26 мая 2023 года / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. – С. 709-712. – EDN ANVPRC.
15. Kritskaya, K. A. Cellular disorders in fibroblasts carrying mutations associated with Parkinson's disease / K. A. Kritskaya, E. I. Fedotova, A. V. Berezhnov // Biophysical Reviews. – 2023. – Vol. 15, No. 5. – P. 1753. – EDN PMSVIX.
16. Mitochondrial pore (mPTP) and cell death / K. A. Kritskaya, O. A. Stelmashchuk, A. V. Berezhnov, A. Y. Abramov // Biophysical Reviews. – 2023. – Vol. 15, No. 5. – P. 1793-1794. – DOI 10.1007/s12551-023-01150-w. – EDN PWCNEP.
17. Fedotova, E. I. Protective effect of intracellular acidification in toxic cellular models of Parkinson's disease / E. I. Fedotova, K. A. Kritskaya, A. V. Berezhnov // Biophysical Reviews. – 2023. – Vol. 15, No. 5. – P. 1808-1809. – DOI 10.1007/s12551-023-01150-w.
18. Закисление внутриклеточной среды активирует митофагию и защищает клетки мозга в токсических и наследственных моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, Н. Р. Комилова, А. Д. Надеев [и др.] // Клеточная сигнализация: итоги и перспективы, Казань, 14–17 сентября 2021 года. – Казань: Издательство ФИЦ КазНЦ РАН, 2021. – С. 120-121. – EDN ZEZVMY.
19. Изменения морфологии митохондриального ретикулума в фибробластах пациентов с наследственными формами болезни Паркинсона / К. А. Крицкая, Д. П. Ларюшкин, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей. Том 1. – Пущино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 333-337. – EDN VOWBCA.
20. Изменения кальций-буферной емкости митохондрий в клеточных моделях болезни Паркинсона / К. А. Крицкая, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей. Том 1. – Пущино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 337-340. – EDN XHZZGT.

21. Источники продукции АФК и защитное действие активатора Nrf2 в фибробластах человека с мутациями, приводящими к развитию болезни Паркинсона / К. А. Крицкая, Е. И. Федотова, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей / Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Том 2. – Пущино: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 530-534. – EDN TNSPTT.

22. Нейропротекторное действие лактата и пирувата в токсических клеточных моделях болезни Паркинсона / Е. И. Федотова, К. А. Крицкая, А. В. Бережнов // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, Серпухов, 20–24 мая 2019 года / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. Том 1. – Серпухов: Типография Пятый Формат, 2019. – С. 104-110. – EDN DSANIW.

Текст диссертации был проверен на использование заимствованного материала без ссылки на авторов и источники заимствования. После исключения всех корректных совпадений, иных заимствований не обнаружено.

Диссертация «Исследование динамики митохондриальной сети в моделях клеточного стресса» Крицкой Кристины Андреевны соответствует критериям, установленным в соответствии с п. 2.1. Федерального закона от 23 августа 1996 г. № 127 «О науке и государственной научно-технической политике» и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, отраженным в «Положении о присуждении ученых степеней» пп. 9–14, утвержденном постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – Клеточная биология.

Заключение принято на Научном семинаре Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

На заседании присутствовало 23 человека.

Результаты голосования: «ЗА» – 23 чел., «ПРОТИВ» – 0 чел., «ВОЗДЕРЖАЛОСЬ» – 0 чел.

Протокол № 30 от 26 сентября 2024 г.

председатель Научного семинара
д.б.н., проф.
главный научный сотрудник
лаборатории механизмов рецепции
Института биофизики клетки Российской
академии наук – обособленного подразделения
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
тел. +7(4967)739418
эл. почта: novoselov-vi@rambler.ru

Новоселов Владимир Иванович



Подпись
Новоселова В.И.
зав. кафедрой

26.09.2024