

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 06.11.2024 г. № 23

о присуждении **Билану Дмитрию Сергеевичу**, гражданину РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация на тему «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований» по специальности 1.5.3 – молекулярная биология принята к защите 05.06.2024 г. (протокол заседания №15) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997, Приказ Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013, а также Приказ Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.).

Соискатель Билан Дмитрий Сергеевич, 11 марта 1988 года рождения.

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук теме «Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры окислительно-восстановительных процессов в живых системах» по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» защитил в 2014 году в диссертационном совете, созданном на базе ГНЦ ИБХ РАН, диплом кандидата наук серия КНД № 000541 от 05.11.2014 г.

В настоящее время Билан Д.С. работает в должности старшего научного сотрудника в Группе метаболических основ патологии Отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в Группе метаболических основ патологии Отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН.

Научный консультант – д.б.н., чл.-корр. РАН, проф. РАН **Белоусов Всеволод Вадимович**, зав. отделом метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН, директор ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА.

Официальные оппоненты:

Абрамов Андрей Юрьевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»; **Брежестовский Петр Дмитриевич**, д.б.н., почетный профессор, профессор кафедры нормальной физиологии Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; **Савицкий Александр Павлович**, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация **Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»** (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА), г. Москва, в своем **положительном** отзыве, подписанном д.х.н. Анной Михайловной Варижук, заведующей отделом клеточной биологии, д.м.н., чл.-корр. РАН Еленой Вадимовной Загайновой, заместителем генерального директора по развитию ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА, и утвержденном генеральным директором ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, д.б.н., чл.-корр. РАН Лагарьковой Марией Андреевной, указала, что по своей актуальности, научной новизне, научному и методологическому уровню, полноте описания и достоверности полученных результатов диссертация Билана Дмитрия Сергеевича полностью соответствует всем критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 №62) и предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 42 работы общим объемом 47 печ. л. по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России, в том числе, 15 обзорных статей. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

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

1. Chebotarev AS, Kelmanson IV, Ivanova AD, Khramova YV, Katrukha VA, Kotova DA, Raevskii RI, Moshchenko AA, Linovsky GN, Fedotov AB, Belousov VV, **Bilan DS***, Lanin AA*. (*corresponding authors). Multiphoton tools for hydrogen peroxide imaging in vivo with subcellular resolution. **Sensors and Actuators B: Chemical**. 2024; 410: 135646. doi.org/10.1016/j.snb.2024.135646.
2. Kostyuk AI, Rapota DD, Morozova KI, Fedotova AA, Jappy D, Semyanov AV, Belousov VV, Brazhe NA, **Bilan DS**. Modern optical approaches in redox biology: Genetically encoded sensors and Raman spectroscopy. **Free Radical Biology & Medicine**. 2024; 217:68-115. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.03.010.

3. Ivanova AD, Kotova DA, Khramova YV, Morozova KI, Serebryanaya DV, Bochkova ZV, Sergeeva AD, Panova AS, Katrukha IA, Moshchenko AA, Oleinikov VA, Semyanov AV, Belousov VV, Katrukha AG, Brazhe N, **Bilan DS**. Redox differences between rat neonatal and adult cardiomyocytes under hypoxia. **Free Radical Biology Medicine**. 2023; S0891-5849(23)01135-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.11.034.
4. Kotova DA, Ivanova AD, Pochechuev MS, Kelmanson IV, Khramova YV, Tiaglik A, Sudoplatov MA, Trifonova AP, Fedotova A, Morozova K, Katrukha VA, Sergeeva AD, Raevskii RI, Pestriakova MP, Solotnikov MA, Stepanov EA, Tsopina AS, Moshchenko AA, Shestopalova M, Zalygin A, Fedotov IV, Fedotov AB, Oleinikov V, Belousov VV, Semyanov A, Brazhe N, Zheltikov AM, **Bilan DS**. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide. **Free Radical Biology & Medicine**. 2023; 208: 153-164. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.004.
5. Pochechuev MS, **Bilan DS**, Fedotov IV, Kelmanson IV, Solotnikov MA, Stepanov EA, Kotova DA, Ivanova AD, Kostyuk AI, Raevskii RI, Lanin AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Real-time fiber-optic recording of acute-ischemic-stroke signatures. **Journal of Biophotonics**. 2022; e202200050. doi: 10.1002/jbio.202200050.
6. Kostyuk AI, Tossounian MA, Panova AS, Thauvin M, Raevskii RI, Ezeriņa D, Wahni K, Van Molle I, Sergeeva AD, Vertommen D, Gorokhovatsky AY, Baranov MS, Vríz S, Messens J*, **Bilan DS***, Belousov VV*. (*corresponding authors). Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives. **Nature Communications**. 2022; 13(1): 171. doi:10.1038/s41467-021-27796-2.
7. Kelmanson IV, Shokhina AG, Kotova DA, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, Panova AS, Borodinova AA, Solotnikov MA, Stepanov EA, Raevskii RI, Moshchenko AA, Pak VV, Ermakova YG, van Belle GJC, Tarabykin V, Balaban PM, Fedotov IV, Fedotov AB, Conrad M, Bogeski I, Katschinski DM, Doepfner TR, Bähr M, Zheltikov AM, Belousov VV, **Bilan DS**. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model. **Redox Biology**. 2021; 48: 102178. doi: 10.1016/j.redox.2021.102178.
8. Smolyarova DD, Podgorny OV, **Bilan DS**, Belousov VV. A guide to genetically encoded tools for the study of H₂O₂. **FEBS Journal**. 2022; 289: 5382-5395. doi: 10.1111/febs.16088.
9. Potekhina ES, Bass DY, Kelmanson IV, Fetisova ES, Ivanenko AV, Belousov VV, **Bilan DS**. Drug Screening with Genetically Encoded Fluorescent Sensors: Today and Tomorrow. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020; 22(1): 148. doi: 10.3390/ijms22010148.
10. Chebotarev AS, Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, Kotova DA, Fetisova ES, Panova AS, **Bilan DS**, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH resolved brain imaging. **Journal of Biophotonics**. 2021; 14: e202000301. doi: 10.1002/jbio.202000301.
11. Kostyuk AI, Panova AS, Kokova AD, Kotova DA, Maltsev DI, Podgorny OV, Belousov VV, **Bilan DS**. In Vivo Imaging with Genetically Encoded Redox Biosensors. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020; 21(21): 8164. doi: 10.3390/ijms21218164.
12. Kostyuk AI, Kokova AD, Podgorny OV, Kelmanson IV, Fetisova ES, Belousov VV, **Bilan DS**. Genetically Encoded Tools for Research of Cell Signaling and Metabolism under Brain Hypoxia. **Antioxidants (Basel)**. 2020; 9 (6): 516. doi: 10.3390/antiox9060516.
13. Pak VV, Ezeriņa D, Lyublinskaya OG, Pedre B, Tyurin-Kuzmin PA, Mishina NM, Thauvin M, Young D, Wahni K, Martínez Gache SA, Demidovich AD, Ermakova YG, Maslova YD, Shokhina AG, Eroglu E, **Bilan DS**, Bogeski I, Michel T, Vríz S, Messens J, Belousov VV. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function. **Cell Metabolism**. 2020; 31 (3): 642-653. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.003.
14. Lanin AA, Pochechuev MS, Chebotarev AS, Kelmanson IV, **Bilan DS**, Kotova DA, Tarabykin VS, Ivanov AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Cell-specific Three-Photon-Fluorescence Brain Imaging: Neurons, Astrocytes, and Gliovascular Interfaces. **Optics Letters**. 2020; 45 (4): 836-839. doi: 10.1364/OL.45.000836.

15. Lanin AA, Chebotarev AS, Pochechuev MS, Kelmanson IV, Kotova DA, **Bilan DS**, Ermakova YG, Fedotov AB, Ivanov AA, Belousov VV, Zheltikov AM. Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging. **Journal of Biophotonics**. 2020; 13(3): e201900243. doi: 10.1002/jbio.201900243.
16. Kostyuk AI, Demidovich AD, Kotova DA, Belousov VV, **Bilan DS**. Circularly permuted fluorescent protein-based indicators: history, principles, and classification. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019; 20(17), 4200. doi: 10.3390/ijms20174200.
17. Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, **Bilan DS**, Kotova DA, Chebotarev AS, Tarabykin V, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Stain-free subcellular-resolution astrocyte imaging using third-harmonic generation. **Optics Letters**. 2019; 44(12): 3166-3169. doi: 10.1364/OL.44.003166.
18. А. Г. Шохина, В. В. Белоусов, **Д. С. Билан**. Генетически кодируемый биосенсор roKate для регистрации редокс-состояния пула глутатиона. **Вестник РГМУ**. 2019; 1: 94-101. doi: 10.24075/vrgmu.2019.013.
19. А.И. Костюк, Д.А. Котова, А.Д. Демидович, А.С. Панова, И.В. Кельмансон, В.В. Белоусов, **Д.С. Билан**. Изменение ключевых параметров метаболизма липидов в тканях мозга крыс при перманентной ишемии. **Вестник РГМУ**. 2019; 1: 50-57. doi: 10.24075/vrgmu.2019.008.
20. Shokhina AG, Kostyuk AI, Ermakova YG, Panova AS, Staroverov DB, Egorov ES, Baranov MS, van Belle GJ, Katschinski DM, Belousov VV, **Bilan DS**. Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry. **Redox Biology**. 2019; 21: 101071. doi: 10.1016/j.redox.2018.101071.
21. **Bilan DS**, Belousov V.V. In vivo imaging of hydrogen peroxide with HyPer probes. **Antioxidants & Redox Signaling**. 2018; 29(6): 569-584. doi: 10.1089/ars.2018.7540.
22. Ermakova YG, Pak VV, Bogdanova YA, Kotlobay AA, Yampolsky IV, Shokhina AG, Panova AS, Marygin RA, Staroverov DB, **Bilan DS**, Sies H, Belousov VV. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range. **Chemical Communications**. 2018; 54: 2898-2901. doi: 10.1039/c7cc08740c.
23. **Д.С. Билан**, А.Г. Шохина, А.С. Панова, В.В. Белоусов. Регистрация динамики соотношения НАД⁺/НАДН в тканях эмбрионов рыб *Danio rerio* с помощью генетически кодируемого биосенсора. **Вестник РГМУ**. 2018; 1: 74-79. doi: 10.24075/vrgmu.2018.005.
24. **Bilan DS**, Belousov VV. New tools for redox biology: From imaging to manipulation. **Free Radical Biology & Medicine**. 2017; 109: 167-188. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.004.
25. **Bilan DS**, Belousov VV. Genetically encoded probes for NAD⁺/NADH monitoring. **Free Radical Biology & Medicine**. 2016; 100: 32-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.018.
26. **Bilan DS**, Belousov VV. HyPer family probes: state of the art. **Antioxidants & Redox Signaling**. 2016; 24(13): 731-751. doi: 10.1089/ars.2015.6586.
27. Ermakova YG, **Bilan DS**, Matlashov ME, Mishina NM, Markvicheva KN, Subach OM, Subach FV, Bogeski I, Hoth M, Enikolopov G, Belousov VV. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. **Nature Communications**. 2014; 5:5222. doi: 10.1038/ncomms6222.

За разработку генетически кодируемых инструментов для медико-биологических исследований Билан Дмитрий Сергеевич удостоен премии Правительства Москвы молодым ученым за 2019 год.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Абрамова А.Ю., отзыв положительный, содержит следующее замечание:

Учитывая высокую вовлеченность измеряемых автором H₂O₂ и гипогалогенных кислот, возникает вопрос о пороге, который приводит к окислительному стрессу.

Проводились или планировались ли одновременные измерения производства гидроперекиси и запуска апоптоза или других (за исключением уровня GSH) маркеров окислительного стресса?

2. Отзыв официального оппонента Брежестовского П.Д., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Стр. 186. Автор, показал, что в эукариотических клетках Grx1-roKate окисляется необратимо, а при использовании Grx1-roCherry наблюдали обратимое изменение сигнала. Автор пишет, что это наблюдалось «...по неустановленной нами причине...». Из сравнения рис. 38 А и Б видно, что в случае использования биосенсора Grx1-roKate была использована концентрация H_2O_2 в 5 раз более высокая, чем в случае измерения с помощью измерения с помощью Grx1-roCherry. Не может это быть причиной наблюдаемых различий?

2). Стр. 189. Текст гласит: «Мы подтвердили, что белок Grx1-roCherry действительно не чувствителен к H_2O_2 вплоть до высоких концентраций 500 мкМ». В этом случае непонятно, как согласовать это с результатом, представленным на рис. 38Б и 42, где наблюдались большие ответы при аппликации 150 мкМ H_2O_2 ? Более того, из концентрационной зависимости на рис.41 видно, что сенсор замечательно отвечает на концентрации H_2O_2 , от 30 мкМ с насыщением около 150 мкМ. По-видимому, ошибка в изложении.

3). Стр. 199. Результаты показывают, что при направленной продукции H_2O_2 в клетках HeLa Kyoto окислительные процессы происходят исключительно в матриксе митохондрий и не распространяются на цитозоль, в то время как в нейронах изменения наблюдаются в обоих компартментах. Автор показал, что добавление ингибитора TrxR в клетки HeLa Kyoto приводят к появлению окисления не только в митохондриях, но и цитозоле. Изменяло ли добавление ауранофина базовый уровень H_2O_2 в этих клетках? Могло ли в нейронах добавление ингибитора TrxR приводить к изменению редокс-статуса, вызванного действием оксидазы D-аминокислот (DAAO)?

4). Рис. 67. Из графика зависимости флуоресцентного сигнала SypHer3s (F490/F405) от значения pH следует, что динамический диапазон этого биосенсора сильно сдвинут в щелочную сторону. По этой причине при анализе сдвигов pH в кислую сторону возможно использование только очень небольшого диапазона. Можно ли модифицировать биосенсор, чтобы сдвинуть чувствительность в сторону более кислых значений?

5). В общем текст тщательно выверен, однако есть несколько опечаток: на стр. 37, 79, 96 и 189.

3. Отзыв официального оппонента Савицкого А.П., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Автором создана целая коллекция флуоресцентных биосенсоров. Регистрация флуоресценции зачастую сопряжена с появлением артефактов измерений особенно в сложных биологических системах. В этом смысле надежнее было бы использовать подход

измерения времени жизни флуоресценции. К сожалению, в работе это не освещено. Созданные инструменты в данном режиме не тестировались.

2). Автором получен уникальный биосенсор *Nurocrates* и впервые расшифрована пространственная структура биосенсора на основе *cpYFP*. *Nurocrates*, несмотря на его полезность, обладает рядом недостатков, среди них чувствительность к изменениям pH, пероксинитриту, не очень высокая амплитуда ответа (до 1,6 раз, при этом некоторые биосенсоры на основе того же флуоресцентного белка демонстрируют изменения сигнала в разы). Почему, имея точные данные о структуре белка, автор не воспользовался ими и не попытался поставить рациональный выбор стратегии мутагенеза с целью улучшить свойства инструмента?

3). В острой фазе ишемического инсульта в клетках мозга крыс *in vivo* автор отмечает небольшую продукцию H_2O_2 . На основе чего автор делает вывод, что концентрация H_2O_2 в данной системе небольшая? Можно ли получить количественную оценку, как это было сделано автором при переводе сигнала биосенсора *SupHer3s* в конкретные величины pH?

4. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Автор пишет, что за неделю, путем введения стрептозотоцина был смоделирован диабет у крыс, установлено достоверное повышение глюкозы в крови. По канонам моделирования диабета, говорить об устойчивом формировании патологии с развитием осложнений (сосудистых) можно только через 3 недели. Что по мнению автора явилось определяющим в особенностях инсульта у крыс с патологией – гипергликемия или сосудистые осложнения СД?

2). Автор выявил большие зоны повреждения и изменения сигналов pH и H_2O_2 сенсоров при гипергликемии, доказывает это изучением срезов. А как клинически (поведенчески) отличались крысы с большими или меньшими повреждениями? Как отличались животные, у которых быстрее проходило восстановление параметров pH и снижение окислительного стресса (автор указывает на неравномерность восстановления после реоксигенации)? На наш взгляд – это очень существенный момент, который мог бы внести коррективы в периоды назначения терапии.

3). Поскольку автор проводил исследования по изолированному определению увеличения содержания H_2O_2 в астроцитах и нейронах, то было бы важно знать, в каких клетках быстрее (не больше) происходит генерация H_2O_2 , не является ли эта молекула сигнальной в системе астроцит-нейрон. На графике есть разрыв в мониторинге показаний с 5 часов до 12 часов, поэтому, очередность не понятна.

4). Технический вопрос по материалу на странице 227. По каким параметрам флуоресценции (интенсивность или время жизни) определяли соотношение $NAD^+/NADH$?

5). Технический вопрос – поясните, пожалуйста, как оптоволоконная установка позволяет регистрировать одновременно сигнал сенсоров в разных координатах мозга? Об этом упоминается, но не описано техническое исполнение.

6). Несущественные комментарии. Пункт 3.2.5 органичнее смотрелся бы в разделах описания установок для визуализации. Работа написана очень хорошим, доступным языком, есть небольшое количество опечаток и некорректных терминов (redox, анальгезия).

5. Отзыв на автореферат доктора биологических наук Белослудцева Константина Николаевича, доцента, проректора по инновационной деятельности, профессора кафедры клеточной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО Марийского государственного университета.

Отзыв положительный, содержит комментарий: хотелось бы узнать о наличии примеров использования биосенсора для регистрации редокс-статуса глутатиона в *in vivo* исследованиях.

6. Отзыв на автореферат доктора биологических наук Гудкова Сергея Владимировича, профессора РАН, руководителя Центра биофотоники ФГБУН ФИЦ Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН.

Отзыв положительный, содержит комментарий: наличие ошибок в терминологии (мультифотонный вместо многофотонный; Рамановская микроспектрометрия вместо спектроскопии комбинационного рассеяния), встречаются опечатки. Предложено обсудить в процессе защиты следующие логические конструкции:

1) В положении 5 выносимом на защиту автор утверждает, что *«в очаге инсульта астроциты характеризуются более окисленным состоянием по сравнению с нейронами»*. Это довольно известное утверждение, диссертант должен пояснить, что конкретно он имел в виду.

2) В автореферате в явном виде не проведен анализ и сравнение разработок автора с существующим инструментарием.

3) В автореферате приведены спектры, представленные в относительных единицах. Хотелось бы узнать квантовую эффективность разработок автора.

7. Отзыв на автореферат доктора биологических наук Зайцева Алексея Васильевича, главного научного сотрудника лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий ФГБУН Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Отзыв положительный, замечаний не содержит.

8. Отзыв на автореферат доктора биологических наук Максимова Евгения Георгиевича, зав. межкафедральной лабораторией физико-химии биомембран, ведущего научного сотрудника кафедры биофизики биологического ф-та МГУ имени М.В. Ломоносова.

Отзыв положительный, замечаний не содержит.

9. Отзыв на автореферат доктора технических наук Мачихина Александра Сергеевича, доцента, зав. лабораторией акустооптической спектроскопии ФГБУН НТЦ уникального приборостроения РАН.

Отзыв положительный, содержит комментарий: в автореферате не представлены схемы проведенных экспериментов, не описаны методы их калибровки и алгоритмы обработки экспериментальных данных.

10. Отзыв на автореферат доктора медицинских наук Мусиенко Павла Евгеньевича, рук. лаборатории нейромодуляции двигательных и висцеральных функций ФГБУН Института физиологии имени И.П. Павлова РАН.

Отзыв положительный, замечаний не содержит.

11. Отзыв на автореферат доктора биологических наук Силачева Дениса Николаевича, зав. лабораторией биохимии двигательных систем НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Отзыв положительный, замечаний не содержит.

12. Отзыв на автореферат кандидата биологических наук Ширмановой Марины Вадимовны, зам. директора по науке ФГБОУ Приволжского исследовательского медицинского университета Министерства здравоохранения РФ.

Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их компетентностью и достижениями в областях науки, соответствующих теме диссертации. Это подтверждается наличием у них большого количества публикаций в ведущих международных и российских изданиях. Профессор Абрамов А.Ю. является специалистом мирового уровня в области исследования механизмов нейродегенерации при различных заболеваниях с участием окислительного стресса в митохондриях и внутриклеточной кальциевой сигнализации. Профессор Брежестовский П.Д. является специалистом мирового уровня в области исследования молекулярных механизмов нервных патологий, в своих работах применяет подходы конфокальной микроскопии с использованием различных генетически кодируемых зондов. Профессор Савицкий А.П. является специалистом мирового уровня в области физической биохимии, разработал обширную коллекцию молекулярных инструментов на основе флуоресцентных белков. Наличие большого опыта работы и высокая квалификация в областях, связанных с исследованиями биохимических процессов в живых системах в норме и патологии, в том числе с применением генетически кодируемых инструментов и современных подходов микроскопии, позволяют представителям ведущей организации и оппонентам объективно оценивать теоретическую и практическую значимость диссертационной работы, а также ее новизну.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований было разработано несколько уникальных молекулярных инструментов для исследования редокс-процессов в живых системах. В частности, впервые на основе красного

флуоресцентного белка был разработан молекулярный инструмент Grx1-roCherry для определения редокс-статуса глутатиона с канонической для данного семейства биосенсоров структурой. Полученный инструмент дополнил коллекцию уже существующих проб, расширив цветовую палитру оптических характеристик, что позволяет регистрировать динамику редокс-состояния глутатиона одновременно в разных внутриклеточных компартментах в мультипараметрическом режиме микроскопии. Автором разработан также биосенсор Нурocrates для активных форм галогенов, на сегодняшний день этот генетически кодируемый инструмент не имеет аналогов. Свойства Нурocrates детально охарактеризованы, в том числе расшифрована пространственная структура данной белковой молекулы, важно отметить, что это сделано впервые для редокс-биосенсора на основе пермутированного флуоресцентного белка. Автором была успешно продемонстрирована эффективность применения биосенсора Нурocrates для исследования галогенирующего стресса, как в клеточных моделях фагоцитирующих клеток, так и тканях *in vivo*, в частности, в модели воспаления при повреждении тканей рыб *Danio rerio*. Кроме того, автор участвовал в разработках и других молекулярных инструментов, позволяющих регистрировать динамику рН, концентрацию пероксида водорода. На различных моделях, включая первичные клеточные культуры кардиомиоцитов и нейронов, ткани рыб *Danio rerio*, ткани мозга грызунов, автором проведено масштабное исследование роли пероксида водорода в развитии патологии тканей при гипоксии/ишемии. Динамика пероксида водорода впервые была визуализирована напрямую в режиме реального времени при развитии ишемического повреждения. Разработаны уникальные подходы исследования редокс-параметров клеток в моделях *in vivo* на основе оптоволоконных интерфейсов и многофотонных подходов микроскопии.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что в представленной работе с помощью разработанных автором молекулярных инструментов получены новые сведения о пространственно-временной динамике некоторых важнейших параметров клеток при нормальных и патологических условиях. С помощью биосенсора Grx1-roCherry в комбинации с уже существующими пробами данного типа представлены выраженные редокс-отличия между разными типами клеток, наглядно показана роль антиоксидантных систем в контроле межкомпаратментных редокс-взаимодействий. С помощью биосенсора Нурocrates впервые визуализирована динамика галогенирующего стресса, развивающегося в фагосомах человеческих нейтрофилов, и в очагах воспаления тканей на модельном объекте *Danio rerio*. Нурocrates является первой белковой молекулой, для которой было проведено подробное исследование воздействия различных биологически значимых окислителей с очень высокой реакционной способностью. Расшифрованная пространственная структура Нурocrates несет ценность для понимания механизмов работы подобных инструментов на основе cpYFP, поскольку такие данные были получены и проанализированы впервые именно для этого белка автором настоящей диссертации. С помощью высокочувствительного

биосенсора НуPer7 впервые была установлена динамика пероксида водорода в клетках в культуре, а также в тканях рыб *Danio rerio* и в тканях мозгах крыс в условиях недостатка кислорода. Автором выпущен цикл работ на эту тему. Главное из этих работ в том, что в условиях *in vivo* при ишемии было обнаружено именно постепенное производство пероксида водорода на более поздних стадиях патогенеза, а не в острой фазе вопреки общепринятому мнению. Митохондрии являются главным генератором пероксида водорода в клетках при гипоксии.

Практическая значимость работы заключается в создании новых генетически кодируемых инструментов для регистрации в живых системах динамики важных редокс-параметров. Полученные инструменты могут быть использованы для реализации многих медико-биологических задач, как для исследования редокс-процессов в норме и патологии в разных моделях, так и для поиска новых подходов терапии, скринингов и оценок эффективности лекарственных препаратов. Разработанные автором модели и подходы *in vivo* регистрации биохимических параметров с помощью генетически кодируемых инструментов являются универсальными, поэтому они могут быть применены для исследования не только механизмов ишемических повреждений тканей, но и многих других заболеваний.

Достоверность полученных в работе результатов не вызывает сомнений. Работа выполнена на высоком методическом и экспериментальном уровне, результаты являются воспроизводимыми. Полученные и использованные автором молекулярные инструменты стали общедоступными, плазмиды с генами инструментов размещены в репозитории Addgene. Данные инструменты активно используются различными лабораториями по всему миру для реализации различных задач. При работе с моделями *in vivo* автором выбраны наиболее популярные и хорошо описанные модели, рутинно используемые в том числе в доклинических испытаниях. Во всех исследованиях на животных поставлены надлежащие контроли. Работа выполнена на современном оборудовании с применением стандартных пакетов программ для последующей обработки данных.

Личный вклад соискателя состоит в том, что биосенсоры Grx1-roCherry и Нуocrates были созданы и протестированы в различных моделях при его непосредственном участии и руководстве. Используемые в работе версии биосенсоров семейства НуPer также были разработаны при участии автора. Цикл работ по исследованию редокс-параметров в живых системах, описанных в диссертации, выполнен при личном участии автора или под его руководством.

На основании вышеизложенного Диссертационный совет 24.1.037.01 заключает, что диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича на тему «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология является законченным научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, в результате которого были получены новые генетически кодируемые

инструменты, а также новые сведения о редокс-процессах в основе ишемических состояний различных типов клеток, а также при развитии воспаления и различных метаболических изменений. Разработан ряд новых подходов для исследований *in vivo*, несущих ценность для медико-биологического сообщества. По своему содержанию, актуальности, научной новизне, полноте описания и достоверности полученных результатов диссертационная работа Билана Д.С. полностью соответствует всем критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. № 101; 25.01.2024 № 62) и предъявляемым к диссертациям на соискании ученой степени доктора наук.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1) Белогуров Алексей Анатольевич, доктор химических наук, заместитель директора по науке ГНЦ ИБХ РАН.

Вопрос касается изменения рН в фагосомах. Как происходило учитывание вклада изменения рН в динамику сигнала биосенсора Нурocrates? Ведь контрольная версия биосенсора является другим белком.

2) Ефремов Роман Гербертович, доктор физико-математических наук, заместитель директора по науке ГНЦ ИБХ РАН.

Возможно ли на основе всех полученных уникальных данных направленным образом менять свойства биосенсоров?

Соискатель Билан Д.С. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1) Билан Д.С. представил графики титрования сигнала биосенсора Нурocrates и его контрольной версии НурocratesCS от значений рН в широком диапазоне. Оба белка демонстрируют одинаковую рН-чувствительность. При этом спектр возбуждения флуоресценции версии НурocratesCS, отличающейся мутацией по ключевому остатку цистеина, не изменяется в присутствии активных форм галогенов. Таким образом, сигнал биосенсора Нурocrates может быть нормализован для учета вклада эффекта рН в целевой сигнал.

2) Билан Д.С. отметил важность развития рациональных подходов в создании и оптимизации свойств биосенсоров путем направленного внесения определенных мутаций в структуру. Расшифровка пространственных структур биосенсоров будет этому способствовать. Однако по-прежнему остается актуальным применение подходов случайного мутагенеза и последующий отбор версий с нужными свойствами. Билана Д.С. активно применяет подходы как случайного, так и рационального дизайна.

На заседании 6 ноября 2024 года диссертационный совет принял решение: за проведение фундаментальных разносторонних исследований в области молекулярных механизмов окислительных процессов в живых системах различного уровня сложности в норме и при патологии, а также за разработку набора уникальных генетически кодируемых инструментов, что в совокупности можно квалифицировать как важное научное достижение в области молекулярной биологии, присудить Билану Дмитрию Сергеевичу ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3. – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 21, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Зам. председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

06.11.2024

