

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН
6 ноября 2024 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени доктора биологических наук

Билана Дмитрия Сергеевича

по теме: **Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo*
исследований**

Специальность 1.5.3 – “Молекулярная биология”

Москва – 2024

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 6 ноября 2024 года.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
2.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(1.4.9)
6.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
7.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
10.	Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
11.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
12.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
13.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
14.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
15.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
16.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
17.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
21.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Уважаемые коллеги, добрый день. Мы начинаем наше заседание очередное диссертационного совета и в повестке дня первым вопросом у нас защита диссертации Биланом Дмитрием Сергеевичем. Тема диссертации «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований». Диссертация представлена на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. молекулярная биология. Научный консультант - доктор биологических наук Всеволод Вадимович Белоусов. Работа выполнена в группе метаболических основ патологии в отделе метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН, нашего института. Официальные оппоненты. Абрамов Андрей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Орловский государственный университет имени Тургенева. Брежестовский Петр Дмитриевич, доктор биологических наук, почетный профессор, профессор кафедры нормальной физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации. Савицкий Александр Павлович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии Института биохимии имени Баха Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук. Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научный клинический центр физико-химической медицины имени академика Лопухина Федерального медико-биологического агентства. Есть ли у присутствующих какие-то вопросы по первому пункту повестки дня? Вопросов нет, тогда Владимир Александрович огласите, пожалуйста, основные положения личного дела.

Уч. секретарь, д.физ.-мат.н., В.А. Олейников:

Да. Значит материалы личного дела. Билан Дмитрий Сергеевич, Российская Федерация. Биофак МГУ окончил в одиннадцатом году. Далее очная аспирантура в нашем институте ИБХ Шемякина-Овчинникова. В четырнадцатом году успешно защитил кандидатскую диссертацию по специальности молекулярная биология по теме «Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры окислительно-восстановительных процессов в живых системах». Шестнадцатый год – победитель конкурса на право получения грантов Президента Российской Федерации. Восемнадцатый – руководитель группы, возглавил группу метаболических основ патологии ГНЦ ИБХ РАН. Девятнадцатый год удостоен премии Правительства Москвы молодым ученым в области разработок биотехнологии за разработку генетически кодируемых инструментов для медико-биологических исследований. Двадцать третий год – награжден нагрудным знаком «Почетный наставник» от Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Сама работа, как было сказано, в группе метаболических основ патологии отдела метаболизма и редокс-биологии Государственного научного центра Российской Федерации наш институт, институт биоорганической химии. Научный консультант – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующий отдела метаболизма и редокс-биологии ГНЦ ИБХ РАН, директор Федерального центра мозга и нейротехнологий ФМБА России – Всеволод Вадимович Белоусов. По теме диссертации опубликовано сорок две работы в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов

диссертации. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК пятого июля, то есть вовремя, и все необходимые документы в деле есть.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Владимир Александрович. Уважаемые коллеги, есть ли у кого-нибудь вопросы по изложенным материалам личного дела соискателя? Вопросов нет, тогда, Дмитрий Сергеевич, вам слово. Пожалуйста, изложите основные положения вашей работы.

Соискатель, Д.С.Билан:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Дмитрий Сергеевич. Так, свет можно включить наш, чтобы видеть задающих вопросы. Пожалуйста, коллеги, вопросы к докладчику. А вот, за экраном не вижу. Да Алексей, пожалуйста.

д.х.н., А.А. Белогуров:

Дмитрий Сергеевич, как всегда, очень интересно. Большое спасибо. Я вот хотел бы вернуться к фагосомам. Если можно, по-моему, в первой части, там были очень такие впечатляющие картинки в динамике. То есть да, ну, например, вот на этой, тут. Вот я хотел бы все-таки обсудить вопрос нормализации на рН. Вот то, что мы видим верху справа, это уже нормализованные значения, или это как бы защелачивание?

Соискатель, Д.С.Билан:

Мы видим... Да, то есть тут можно откалибровать. Вот, собственно, мы смотрим сам сенсор это синяя линия, а красным это его модифицированная версия, которая не чувствует гипогалогенные кислоты, а другие параметры все такие же, то есть рН-чувствительность она такая же. И это вот красная линия. То есть, соответственно, вот эта вот дельта между ними – это как раз вклад в сигнал именно уже галогенирующего стресса. То есть в принципе, я мог, например, отнормироваться, убрать компоненту рН. И этот график, он был бы ниже, но тенденция была бы такая же. Так в принципе и делают, то есть можно отнормализоваться, и это будет единая кривая. Просто я здесь хотел показать, как получаем две кривые, потом можем уже алгоритмом вычитать.

д.х.н., А.А. Белогуров:

То есть амплитуда просто станет в два раза меньше?

Соискатель, Д.С.Билан:

Да, но он будет чище.

д.х.н., А.А. Белогуров:

Но тем не менее эффект... То есть эффект будет виден. А вот как вы показывали, интересно, что эти два белка абсолютно одинаково реагируют на рН, все-таки они же разные?

Соискатель, Д.С.Билан:

Они разные по одной аминокислоте, на самом деле. То есть мы убираем активный цистеин... и все. И, конечно же, мы все это детально характеризуем. Так, сейчас, тут у меня столько дополнительных слайдов, что... а, собственно, сейчас, вот...

д.х.н., А.А. Белогуров:

Если что, я не обсуждал с докладчиком...

Соискатель, Д.С.Билан:

Нет, мы не обсуждали, конечно же. Вот она, собственно, контрольная версия для Nurocrates. То есть мы вносим модификацию по цистеину, который, собственно, подвергается галогенированию. Вот так меняются спектры. То есть он никак не меняется, то есть не отвечает. А при этом вся рН-титровка, она один в один. И, соответственно, мы можем на эту дельта изменения рН оценивать компоненту рН в наш целевой сигнал. И говорить, есть продукты галогенирующего стресса или нет.

д.х.н., А.А. Белогуров:

А когда соотношение, это вычитание все-таки или деление?

Соискатель, Д.С.Билан:

Там разные подходы.

д.х.н., А.А. Белогуров:

То есть абсолютный сигнал вы нормируете или все-так берете соотношение? То есть по-разному...

Соискатель, Д.С.Билан:

Соотношение. Соотношение скорее да.

д.х.н., А.А. Белогуров:

Соотношение. Спасибо большое.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Так, коллеги, еще вопросы? Пожалуйста. Ну, я тогда пока воспользуюсь паузой. Хочу тоже свой вопрос задать. Дмитрий Сергеевич, вопрос больше методический, то есть вот как вы считаете... Просто учитывая природу молекулярную, структуру и поведение этих сенсоров. То есть два сложных, достаточно больших белка, гибкий линкер и так далее. Возможность ассоциации и GFP, и, наверное, второго белка тоже с взаимодействием с другими белками в среде... И тем не менее, применение впечатляющее, очень интересно. Но вот как вы считаете... Это как бы удалось? У меня вопрос по рациональному дизайну, то есть насколько сейчас на основе всех полученных этих уникальных интересных результатов вы можете как-то направленным образом теперь менять эти сенсоры, чтобы эффект сдвинуть в определенном направлении? Потому что... Ну или достаточно просто некоей такой интегральной картинкой? Потому что тонкие спектральные характеристики, ясно, будут зависеть от локального микроокружения. Но вы видите там комбинацию флуоресценции ансамбля молекул, каждая из которых имеет свой характерный спектральный профиль. Ну вот вам, предположим, теперь захотелось что-то изменить, ну сделать сенсор более чувствительным к каким-то там параметрам среды и так далее. Вы как считаете, насколько вы владеете вот сейчас этой технологией такого вот направленного изменения свойств сенсоров? Очень интересно.

Соискатель, Д.С.Билан:

Да, спасибо большое, это очень интересный вопрос, очень правильный, потому что, как вы знаете, Нобелевскую премию дали за AlphaFold. И я думаю, что искусственный интеллект со временем вытеснит нас в плане вот оптимизации, каких-то модификаций именно по структурам, например. И вот когда мы получили расшифрованную структуру для Nurocrates, собственно, она вот перед вами. Наш друг Йоррис он просто через точку с запятой написал нам вот какие остатки нужно дергать, чтобы как-то изменить эти свойства. И мы, соответственно, с ребятами начали эти свойства менять. И ничего не

получилось, то есть в основном это либо потеря флуоресценции, либо как-то хуже отвечает и так далее. То есть пока что приходится где-то... То есть мы скорее оперируем областями, то есть что касается Nurocrates я на своей защите представил первую версию, на самом деле сейчас есть и Nurocrates2, и красный Nurocrates мы делаем, и Nurocrates третий, который мы для диагностики сейчас пытаемся сделать. Но в основном это получалось так, что мы комбинировали случайный мутагенез и там, где мы видели какие-то подвижки, мы начинали сосредотачиваться. Например, мы понимаем, что вот эта петля – она важна. И ставим вырожденные праймеры и пытаемся там как-то эту петлю подергать, посмотреть. Или вот как вот в плане красных белков, я показывал, что были задумки, например, расшатать структуру, внести аминокислоты дополнительные или посмотреть будет ли влиять заряд. Ну то есть это такой полурутинно... полуручной... проб и ошибок скорее. Но вот, с другой стороны, вот эта структура, это, по сути, первая расшифрованная для биосенсоров данного типа. Наверное, если бы их было несколько, и со временем мы будем видеть какие-то закономерности, и вот может быть, это можно будет как-то более рационально дизайнировать.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, очень интересно. То есть первая структура с высоким разрешением получена она... это как бы одна из, и вы пока не добрались до этих вот тонких каких-то...

Соискатель, Д.С.Билан:

Ну мы работаем, наши коллеги структурные биологи, более профильные.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Это понятно. Нет, результат, он как бы впечатляющий.

Соискатель, Д.С.Билан:

Спасибо.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

То, что вы это применяете и в разных областях и разные задачи решаете. Ну да, интересно с точки зрения структуры потом разобраться. Ну и я бы не стал так на AlphaFold прям такие надежды возлагать. Ну ладно, это отдельная тема.

Соискатель, Д.С.Билан:

Да я тоже не надеюсь, но Нобелевскую премию дали не просто так же.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Ну, понятно. Коллеги, еще вопросы? Не вижу. Спасибо. Тогда, Дмитрий Сергеевич, пожалуйста, присаживайтесь. Владимир Александрович, заключение, пожалуйста, организации, где выполнялась работа. Зачитайте нам.

Уч. секретарь, д.физ.-мат.н., В.А. Олейников:

Да, но, во-первых, заключение организации. Организация — это наш институт.

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный)

Заключение было на основании решения открытого межлабораторного семинара отдела метаболизма и редокс-биологии. Вот, ну и здесь сначала начинается заключение с биографических неких данных, которые я уже огласил в начале. Ну и, по существу, значит актуальность темы исследования: диссертация посвящена разработками и применению новых инструментов в области редокс-биологии, вот, большинство редокс-активных соединений из-за характерных коротких времен жизни трудно и даже вовсе невозможно обнаружить с применением инструментальных подходов классической аналитической

химии. Создание биосенсоров на основе флуоресцентных белков во многом способствовало развитию этого направления. Ну и, собственно, так сказать очень хорошо уже сформулировал сам Дмитрий Сергеевич актуальность и фактически здесь другими словами написано и подчеркивается актуальность данного направления. И главное преимущество генетически кодируемых биосенсоров заключается в возможности их применения в условиях *in vivo*. Новизна. В диссертационной работе Билана представлены новые типы генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров. Под руководством Билана был создан биосенсор *Nurocrates* для регистрации активных форм галогенов и на сегодняшний день этот инструмент не имеет в мире аналогов. Ценность работы. Под руководством Билана были разработаны генетически кодируемые биосенсоры *Gtx-goCherry* с красной эмиссией флуоресценции для определения редокс-статуса глутатиона и биосенсор *Nurocrates* для регистрации динамики гипогалогенных кислот и их производных. Степень достоверности, подчеркивается то, что не вызывает сомнений. Основные результаты представленной работы получены с помощью генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров. Свойства инструментов были исследованы в разных лабораториях независимым образом. Полученные результаты демонстрируют высокую степень сходства. Ну и фактически это подчеркивает достоверность, правомерность результатов проведенных исследований. Личное участие, ну подчеркивается, что биосенсоры *goCherry* и *Nurocrates* были получены и протестированы под руководством Дмитрия Сергеевича Билана. Работы по исследованию редокс-процессов в условиях гипоксии и ишемии в моделях на клеточных культурах, тканях рыб *Danio rerio*, в тканях крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта выполнены лично Биланом или под его руководством. Ну отмечается соучастие Желтикова и группы Желтикова и Александра Александровича Ланина, ну и Рамановская микроскопия при сотрудничестве с Надеждой Александровной Браже. Соответствие представленной работы специальности подчеркивается, что соответствует специальности 1.5.3. молекулярная биология. Ну и наконец успешная проверка работы на оригинальность и отсутствие заимствований. Ну, как я уже сказал, заключение принято на заседании открытого межлабораторного семинара отдела метаболизма и редокс-биологии. Присутствовали двадцать четыре человека, все за, единогласное голосование. Подписано секретарь семинара Храмова, замдиректора ГНЦ ИБХ РАН Илья Викторович Ямпольский, и заключение утверждено директором нашего института академиком Габибовым Александром Габибовичем. Это по поводу заключения организации.

Теперь отзыв Ведущей организации, в качестве которой выступала Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физхимии имени академика Лопухина ФМБА.

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный)

Отзыв Ведущей организации полностью положительный, и опять же подчеркивается актуальность темы диссертации. Вот здесь во введении пишется до недавнего времени главная трудность в изучении внутриклеточных процессов с участием низкомолекулярных соединений с высокой химической активностью, примерами которых выступают представители классов активных форм кислорода, азота, серы, галогенов, заключалось в ограничениях инструментальных баз. Ну далее подчеркивается, что вот эта вот новая инструментальная база, которая создана Биланом, это как раз очень актуальное направление исследований. Научная новизна, опять же подчеркивается, что новые типы разработаны генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. В частности, впервые получены сенсоры для регистрации окислительно-восстановительного статуса глутатиона. Впервые с помощью генетически кодируемых инструментов в разных типах клеток были исследованы особенности межкомпарментных окислительно-восстановительных взаимодействий. В работе Билана представлен сенсор *Nurocrates* для регистрации динамики продуктов галогенирующего стресса. И подобный инструмент не имеет аналогов в мире. Научная и практическая ценность, значит, научная тут целая серия тех

достижений, о которых мы только что слышали в докладе Дмитрия Сергеевича. Практическая значимость определяется созданием новых молекулярных инструментов для исследований окислительно-восстановительных процессов. Созданные Биланом Дмитрием Сергеевичем платформы исследований с применением генетически кодируемых инструментов, вне всякого сомнения, будут использованы для реализации множества задач, включая как исследования особенностей патогенеза других заболеваний, так и разработка новых подходов к их терапии. Обоснованность и достоверность. Выбор моделей, методов исследований, статистическая обработка полученных данных адекватны поставленной цели и задачам. Выводы работы полностью базируются на совокупности приведенных данных, так что научные положения, выводы и заключение работы можно считать достоверными. Полнота освещения положений и результатов в публикациях, ну уже было сказано, что опубликовано сорок две статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, ну среди них такие высокорейтинговые журналы, как Nature Communications, Cell Metabolism, Redox Biology, Free Radical Biology and Medicine и ряд других. Подчеркивается, что представлены в виде докладов на многочисленных мероприятиях международного и всероссийского уровней. Структура работы. Соответственно она изложена на триста пятидесяти двух страницах текста, включает, соответственно, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение и выводы. Содержание диссертации дает основание для представления данной работы по специальности 1.5.3. молекулярная биология. Работа написана хорошим научным языком, логично выстроена, в качестве достоинств данной диссертационной работы необходимо отметить оригинальность разработанных автором редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков. В совокупности с обширным объемом исследований эти новые подходы позволили автору получить целый ряд новых данных о механизмах повреждения при ишемическом инсульте и при развитии воспаления. Вопросы и замечания. Принципиальных замечаний к рецензируемой диссертационной работе нет. Но есть уточняющие вопросы и комментарии. Автор впервые изучает в динамике развитие ацидоза и повышение концентрации пероксида водорода в модели ишемического инсульта мозга крыс, показывает особенности развития ацидоза в динамике и окислительного стресса. Далее идет сравнение развития указанных изменений у здоровых крыс и у крыс с моделированным сахарным диабетом. Безусловно, эксперименты создания оптоволоконная... созданная оптоволоконная установка *in vivo* регистрации сигналов биосенсоров революционные, но есть несколько уточняющих вопросов. Автор пишет, что за неделю путем введения стрептоцина 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 три недели. Что по мнению автора явилось определяющим в особенностях инсульта у крыс с патологией, гипергликемия или сосудистые осложнения сахарного диабета? Авторы выявил большие зоны повреждения, изменения сигналов рН и пероксида водорода сенсоров при гипергликемии. Доказывает это изучением срезов. А как клинически, поведенчески отличались крысы с большими и меньшими повреждениями? Как отличались животные, у которых быстрее проходило восстановление параметров рН и снижение окислительного стресса. Автор указывает на неравномерность восстановления после реоксигенации. На наш взгляд, это очень существенный момент, который мог бы внести коррективы и в периоды назначения терапии. Далее, поскольку автор проводил исследования по изолированному определению увеличения содержания H₂O₂ в астроцитах и нейронах то было бы важно знать в каких клетках быстрее, не больше, происходит генерация пероксида водорода. Не является ли эта молекула сигнальной в системе астроцит-нейрон? На графике есть разрыв в мониторинге показаний с пяти до двенадцати часов. Поэтому очередность не понятна. Технический вопрос по материалам на странице 227, по каким параметрам флуоресценции, интенсивность или время жизни, определялись соотношения

НАД+/НАДН? Технический вопрос, поясните, пожалуйста, как оптоволоконная установка позволяет регистрировать одновременно сигнал сенсоров в разных координатах мозга? Об этом упоминается, но не описано техническое исполнение. Далее не существенные комментарии. Пункт 3.2. биосенсоры на основе желтого белка в мультифотонном режиме возбуждения флуоресценции органичнее смотрелся бы в разделах описания установок для визуализации, так как описывает принципиальную, очень важную возможность наблюдать флуоресцентные сенсоры в многофотонном режиме и тем самым увеличивать глубину визуализации структуры мозга. Работа написана очень хорошим, доступным языком, но есть небольшое количество ошибок и некорректных терминов. Употребляется редокс в английском варианте написания и редокс в русской транскрипции. Поскольку русский термин существует, то можно было бы оставить только его. Страница 176 использует слово анальгезия, правильное анестезия для местного обезболивания. Но опять же поставленные вопросы и замечания носят дискуссионный характер, не могут умалить ценность полученных автором новых достоверных и имеющих большую практическую значимость результатов. Ну и в заключении указывается, что работа Дмитрия Сергеевича Билана на тему «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований» представляет собой оригинальный, самостоятельный и законченный научный труд, изложенный в традиционной форме, ну и так далее. И полностью эта работа соответствует требованиям Положений о порядке присуждений ученых степеней, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. молекулярная биология. Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании отдела клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Лопухина ФМБА России и подписано, доктор химических наук, завотделом клеточной биологии Варижук Анна Михайловна и доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, заместитель генерального директора по развитию этого института Загайнова Елена Вадимовна. Ну и наконец отзыв утвержден генеральным директором ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Лопухина ФМБА России, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН Лагарькова.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Владимир Александрович. Дмитрий Сергеевич, ответьте, пожалуйста, на вопросы, которые содержались в отзыве Ведущей организации.

Соискатель, Д.С.Билан:

На самом деле получил огромное удовольствие, общаясь с медиками. Потому что сразу стало понятно зачем и вообще, как мы можем помогать медицине. Очень интересные и правильные вопросы. Первый вопрос по поводу того, что мы все-таки моделируем - высокий статус глюкозы или диабет. Ну вот стрептозотоцин, который мы использовали, он тоже... эта модель была придумана не нами, то есть мы руководствовались наиболее какими-то стандартными методами. И вот стрептозотоцин во всей литературе, в том числе в комбинации с ишемическими состояниями, активно используется. Сама эта молекула, конечно, не очень хороша, потому что попадает она не только в бета клетки, но и токсична для каких-то других. Собственно, что было, то мы и используем, хотя можно использовать какие-то другие подходы – хемогенетические, например. И отвечая на вопрос, нас интересовал именно высокий статус глюкозы, то есть понятно диабет это состояние более сложное, затрагивает комплекс различных тканей. Но нам хотелось понять, а что вот именно в пике высокой глюкозы, потому что как раз многие молекулярные механизмы, вот при отклонении метаболизма они завязаны на этот высокий статус. То есть при высокой глюкозе, например, наблюдается и активация НАДФН-оксидаз, и там сигнальные пути через протеинкиназу-С и ERK, и увеличивается уровень экспрессии отдельных субъединиц, и вот зная это все по литературе, хотелось понять, вот как мы могли бы эту острую фазу поймать. Поэтому, ну наверное мне следовало просто аккуратно не называть это диабетом, а везде писать «гипергликемия».

Но вопрос, конечно правильный, мы не оценивали, как меняются сосуды, как меняются какие-то другие органы и ткани при диабете, ну и, собственно, смотрели мы острую фазу. То есть, эксперимент проходил на где-то месяце примерно. Что касается, как чувствовали себя крысы, - плохо. И здесь мы как раз воочию убедились, как отклонения метаболизма влияет на один и тот же патогенез. То есть если у нас в исходной группе смертность была нулевая, то у животных, у которых был высокий статус глюкозы, 36% умерло. И на тот момент мы не чувствовали в себе компетенции делать поведенческие тесты. Сейчас мы к этому движемся. Но и невооруженным глазом было видно, что звери чувствуют себя очень плохо. И поэтому коррелирует очень хорошо – глюкоза действительно усугубляет инсульт. Что касается того, как... Там вопрос был по поводу того, что вот динамика ацидоза восстанавливалась, и как-то это коррелировало или нет? Тут интересно. Потому что, когда мы стали наблюдать, что примерно через сутки после окклюзии сосуда динамика ацидоза возвращалась... рН возвращался примерно к исходному значению, мы думали, отлично, теперь мы сможем прогнозировать, где ацидоз завис – там будет тяжелее. Оказалось, никакой корреляции нет. То есть были животные, у которых, например, все окислено, вот просто по максимуму, а оно ходит, ест. И были те, у которых сигнал возвращался полностью в норму, но они были плохи по своему состоянию. Вопрос, касаемый астроцитов и нейронов вот этой вот схемки. Собственно, почему вот здесь пробел между пятью и двенадцатью часами. Ну, во-первых, физически это было сложно реализовать. Вот над этой картиной работало реально несколько бригад по хирургии, то есть в несколько смен, то есть одни люди делали измерения, другие люди делали операции, то есть это в том числе какие-то ночные были времена. И нужно было еще щадить животных, потому что... ну животным плохо и каждый раз подводить волокно – не очень хорошо с точки зрения их самочувствия, хотелось их дотянуть до конца эксперимента. Ну а главное, что мы не знали где смотреть, то есть, когда мы острую фазу не увидели, что что-то драматичное происходит, мы стали смотреть пролонгированные времена. Ну и вы видите, что между пятью и десятью часами действительно просто идет тенденция к увеличению. А по уровню, точнее по скорости астроцитов, я хочу показать вам очень интересный эксперимент. Он не вошел в диссертацию, но он очень хорошо дополняет вот эту концепцию. То есть опять же в коллаборации с Надей Браже мы сделали такую модель – модель фототромбоза. Это мышке делается краниальное окно и дальше закалывается специальная краска, которая фотоактивируема. То есть после закола краски мы можем сосредоточиться на сосуде, активировать, там возникает фототромбоз, потому что краска под действием света производит синглетный кислород. И вот мы видим, как сосуд у нас затыкается, то есть он как коагулируется. И вот в этой области можно снимать Рамановские спектры. Во-первых, очень хорошо различается гемоглобин – его окси-/дезоксид- форма. То есть мы точно знаем, что вот в этом локальном участочке возникает ишемия. А потом, собственно, используя наши биосенсоры, мы можем точно также отличать астроциты и нейроны, мы можем сравнивать электрон-транспортную цепь. И вот оказалось, что астроциты, они и по этому параметру, то есть по степени загрузки электронов... электрон-транспортной цепи, они гораздо сильнее обгоняют нейроны. Причем это состояние наблюдается вот именно с первых же минут, то есть мы можем с уверенностью сказать, что да, астроциты они более такие редокс нестабильные, то есть у них и эта цепь перегружается раньше, и впоследствии мы и пероксид видим, что его образуется больше дальше. И, собственно, здесь как раз вот дискуссия о дальнейших механизмах, и мы работаем над этим. То есть загрузка электрон-транспортной цепи она означает что? Что утечка рано или поздно произойдет, и произойдет она на кислород, но конвертация в пероксид водорода вовсе не обязательна, то есть это может уйти, например, на пероксинитрит. Вот. Это вот вопрос про астроциты и нейроны. И... по каким параметрам определяли НАД/НАДН, была интенсивность или время жизни флуоресценции? Это сенсор – сенсор SoNar, который мы использовали, то есть по интенсивности флуоресценции. Технический вопрос, как мы можем регистрировать

сигнал одновременно в разных координатах? Это, собственно, наша установка, я показывал фотографии с волокнами, ну, собственно, сколько волокон, столько и координат. Вот, например, наша сейчас установка, которая была собрана ребятами, стоит в ИБХ, она позволяет до семи каналов смотреть. И про комментарий, что пункт 3.2.5. органичнее смотрелся бы в разделах описания установок. Ну соглашусь, да. Спасибо большое.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Владимир Александрович, поступили ли какие еще отзывы на диссертационную работу?

Уч. секретарь, д.физ.-мат.н., В.А. Олейников:

Да, совершенно верно, поступили отзывы на автореферат. Их целых восемь. Они все положительные.

(зачитывает отзывы, отзывы прилагаются, все положительные)

Поэтому я значит для начала просто некоторую часть зачитаю откуда. Ну, во-первых, отзыв на автореферат доктора биологических наук зав межкафедральной лабораторией физико-химии биомембран, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биофака МГУ имени Ломоносова, Евгений Георгиевич Максимов. Значит, положительный отзыв. Отзыв на автореферат, тоже полностью положительный, подписано главный научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии имени Сеченова, доктор биологических наук, Зайцев Алексей Васильевич. Далее, далее отзыв тоже полностью положительный, подписан Мусиенко П.Е., доктор медицинских наук, руководитель лаборатории нейромодуляции двигательных и висцеральных функций Института физиологии имени Павлова. Отзыв, тоже положительный, довольно большой, видите целых три страницы, зав лабораторией биохимии двигательных систем НИИ физхимии биологии имени Белозерского Московского Государственного Университета имени Ломоносова, Силачев Денис Николаевич. Значит, вот из этого отзыва я даже хочу зачитать некоторый вариант. Значит, представлено Биланом несколько совершенно новых генетически кодируемых биосенсоров, появление новых инструментов в виде таком, кодируемых генетически сенсоров, всегда сопряжено с дальнейшим получением уникальной информации об исследуемых параметрах. Ну и опять же подчеркивается, что опубликовано сорок две статьи, среди публикаций есть три статьи в журнале Nature Communications. Это значит подписал кандидат биологических наук, замдиректора по науке НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, значит это Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава Российской Федерации, Ширманова Марина Вадимовна подписала. И вот еще последние три отзыва. Тут некие есть замечания. В качестве замечания, не снижающего общего положительного, впечатления от работы, отмечено недостаточно подробное описание методической стороны, проведенных исследований. В автореферате не представлены схемы проведенных экспериментов, за исключением рисунка семнадцатого. Не описаны методы их калибровки и алгоритмы обработки экспериментальных данных. Ну опять же, не снимает общего положительного впечатления. Подписано доктор технических наук, это научно-технологический центр уникального приборостроения, зав лабораторией акусто-оптической спектроскопии Мачихин Александр Сергеевич. Далее отзыв, в котором довольно много замечаний. Хотелось бы отметить наличие ошибок в терминологии, например, мультифотонный вместо многофотонный, Рамановская микроспектроскопия вместо спектроскопии комбинационного рассеяния. Вот, в некоторых предложениях пропущены слова, очень часто не пишется словосочетание «изменение концентрации». Положения, выносимы на защиту сформулированы в стиле разработано что-то или охарактеризовано что-то. Сам

автореферат имеет примерно в два раза больший объем, чем рекомендует ВАК Российской Федерации. По существу, предлагаю обсудить в процессе защиты следующие логические конструкции, не лучшим образом отраженные в автореферате, но вероятно детальнее описанные в статьях диссертанта. В положении 5, выносимом на защиту, автор утверждает, в очаге инсульта астроциты характеризуются более окисленным состоянием по сравнению с нейронами. Мне кажется это довольно давно известное утверждение. Мне кажется, диссертант должен пояснить, что конкретно он имел в виду. Далее, автор разработал довольно интересные инструменты для оценки параметров окислительного стресса, некоторые первые в мировой истории. Однако в автореферате в явном виде не проведен анализ и сравнение разработок автора с существующим инструментарием. Мне кажется, в процессе защиты имеет смысл обсудить данный вопрос. Далее, в автореферате приведено некоторое количество спектров, однако все спектры представлены в относительных единицах. При этом читатели не могут сравнить спектры между собой. В идеале хотелось бы узнать квантовую эффективность разработок автора, в минимальном режиме можно озвучить какие-либо ориентиры, позволяющие проводить сравнения спектров хотя бы по порядку величин. Но опять же вопросы не влияют на высокую оценку. Подписано Гудков Сергей Владимирович, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН еще, руководитель центра биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр Институт общей физики имени Прохорова Российской академии наук. Ну и наконец последний. Несмотря на в целом положительное отношение к работе имеется небольшой вопрос. Хотелось бы узнать о наличии примеров использования биосенсора для регистрации редокс-статуса глутатиона в *in vivo* исследованиях. В автореферате об этом не сказано. Проректор по инновационной деятельности, профессор кафедры биохимии, клеточной биологии и микробиологии, значит это Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Марийский государственный университет, доктор биологических наук, Белослудцев Константин Николаевич. Вот все.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Владимир Александрович. Дмитрий Сергеевич, ответьте, пожалуйста, тут были замечания в отзывах на автореферат.

Соискатель, Д.С.Билан:

В той же последовательности буду идти тогда. По поводу того, что в автореферате не представлены экспериментальные схемы, калибровки, алгоритмы обработки. При всем уважении к Александру Сергеевичу не считаю, что это следовало бы делать в автореферате. Вопросы о том, что наличие ошибок в терминологии. Не считаю это ошибками терминологии. Англицизм да, но не ошибки терминологии. Комментарий по поводу пропущенных слов, ну наверное самое простое извиниться, хотя, наверное, в отзыве тоже нужно указать места, где это было сделано, потому что довольно скрупулезно отношусь к своим текстам. По поводу того, что астроциты характеризуются более окисленным состоянием по сравнению с нейронами – это известный факт. Эта тема всегда на самом деле вызывала споры. И это неоднозначно, потому что вообще-то астроциты, они характеризуются многими параметрами, по которым их можно наоборот назвать, что они более редокс-стабильные в плане окисления. То есть, например, в астроцитах просто больше глутатиона раза в два, у них работает maquinaria синтеза глутатиона эффективнее, у них антиоксидантные системы представлены лучше. Поэтому здесь, как бы даже мы и не пытались понять, насколько вот они отличаются, да. То есть мы просто изучали острую фазу инсульта и нашли вот такой результат. И мы это объясняем тем, что астроциты даже будучи настолько восстановленными, они так стараются помочь окружающим нейронам, что сами уходят в какое-то переокисление. Поэтому прокомментирую этот вопрос так. В явном виде не проведен анализ и сравнение

разработок... моих разработок с существующим инструментарием. В автореферате я это не приводил, а в диссертации целая глава про это. Представлены спектры, представлены в относительных единицах, хотелось бы узнать квантовую эффективность. Конечно же, все наши инструменты мы проверяем на все, то есть это просто батарея тестов, в том числе промерены все квантовые выходы. И вот для каждого инструмента примерно вот такая табличка, где мы оцениваем все коэффициенты, и насколько он яркий, и в каких состояниях – окисленный или восстановленный, и каким субстратом он окислялся – все это есть, именно в диссертации. И кажется... а вот еще на третий, хотелось бы узнать о наличии примеров использования биосенсора для регистрации редокс-статуса пула глутатиона. Да, примеры есть, собственно, в оригинальной статье про Grx-roCherry, который мы опубликовали в Redox Biology, там у нас в качестве *in vivo* объекта была рыбка *Danio rerio*. Мы смотрели воздействие окислительного стресса с помощью этого инструмента. Кажется, я на все ответил.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Спасибо, так коллеги, теперь мы переходим к слушанию отзывов официальных оппонентов. Андрей Юрьевич Абрамов, пожалуйста

Официальный оппонент, д.б.н., А.Ю. Абрамов:

(отзыв прилагается, отзыв положительный)

Ну, я свой официальный, по сути дела, отзыв уже представил, поэтому я хочу, может быть, провести это немножко в менее формальной..., скажем так, форме. Я хочу сказать, что всегда бывает сложно рецензировать, оппонировать диссертации, но вот данная диссертация, пожалуй, один из таких очень приятных моментов, когда и читаешь диссертацию, и по сути дела понимаешь, что многие из этих вещей, по сути дела, уже и доказаны и большим количеством работ и, в целом, докторская диссертация, она является каким-то уже следующим шагом, когда вроде бы человек доказывает свою состоятельность в науке и состоятельность, в целом, своей работы. И научная работа очень часто по сути дела может быть оценена двумя вещами. Насколько продукт этой работы используется другими учеными. И насколько цитируемы работы, то есть насколько они замечены научным сообществом. И я хочу сказать, что в данном случае все очень хорошо и, что можно говорить, и о цитируемости тех частей работы, которые представлена в диссертации, и в использовании. Поэтому, когда мы говорим о непосредственно уже про какое-то научное такое сообщество, то, мне кажется, ни у кого не возникает сомнение... ну то есть, оказавшись где-то на конференциях, связанных с редокс-биологией, непосредственно с окислительно-восстановительной – мне нравятся, на самом деле, оба термина. Поэтому всегда можно увидеть, скажем, работы, в которых были использованы... с теми инструментами, о которых сегодня говорилось. И я хочу сказать, что... в целом, еще, непосредственно по отдельным пунктам. Когда мы говорим о инструментах, которые нам надо бы использовать, мы очень часто ограничены тем, что мы не можем использовать в каком-то спектре. И вот как раз работа по поводу mCherry, она как раз дает возможность производить измерения совместно с какими-то другими параметрами в клетке, что на самом деле всегда хорошо. То есть это снимает достаточно большое напряжение, скажем, на наши клетки, которые мы меряем, не важно. И то, что это можно использовать *in vivo*. Следующее, то есть, по сути дела... когда в работе представлен еще новый зонд, который, по сути дела, правильно отмечено, не имеет аналогов – это по гипогалогенам. Тут, с одной стороны, кажется насколько узкая область и что практически, мы ничего не знаем, но мы действительно ничего... знаем очень мало, но без инструмента, без попытки измерения, понятно, что мы так никогда ничего и не узнаем. Поэтому, то есть, те же самые... учитывая, что в редокс-биологии все происходит достаточно быстро. По сути дела, настоящих изменений без таких инструментов проходить не может. То есть очень интересная работа по поводу измерения Рамановской

спектроскопии, почему? Потому что даже это подтверждает... Сама работа подтвердила на самом деле, ну, в какой-то мере, известный факт различия между неонатальными кардиомиоцитами и взрослыми, потому что, ну, во-первых, это все-таки ишемическая, скажем, не то, что ишемия, а во-первых, это совершенно другое питание и кровь. Я имею ввиду то, что, опять... когда подтверждение — это не знак минус, это не новая работа, а скорей это говорит о том, что, по сути дела, подтверждение того, что этим методом можно получать такие данные, какие мы не можем получать ничем другим, но этот метод работает достаточно четко и позволяет нам делать измерения какие-то. И, наверное, в завершение, не в завершении, хочу, то чтоб долго в принципе не затягивать, описание этой очень, повторюсь хорошей работы, которая вообще не вызывает никаких сомнений, по сути дела, и в детализации, и в ее успешности. Я бы просто... очень часто, как говорится, то есть именно достоинство работы очень часто ведут может какому-то, я не хочу сказать недостатку, но тем не менее, скажем, к какой-то уязвимости. И мы знаем, что очень долго вот то, что сейчас называется редокс-биологией и всем остальным, оно очень долго именно рассматривалось непосредственно как окислительное повреждение и участие в старении, в чем угодно. Сейчас, конечно, совершенно все поменялось, поменялось понимание. И мы понимаем, что это достаточно быстрые переходы, особенно когда мы говорим про супероксид анион, который работает... время жизни которого одна нс. Но вопрос, тем не менее, остался. Вот где, вот эта вот грань между редокс-биологией, непосредственно редокс-сигнализацией, и где же та грань, где наступает патология. И как раз мой вопрос непосредственно относится к тому, то есть каким образом мы можем, благодаря может в какой-то мере инструментам полученным, попытаться определить эту грань между... обычное участие свободных радикалов и не обязательно свободных радикалов, просто активных форм как кислорода, таких и других соединений в физиологии, скажем так, и как это может быть... как мы можем понимать патологию в данном случае. То есть это вот мой вопрос. В целом, работа полностью заслуживает докторской диссертации... извините... просто передо мной листика нету.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:
Присуждении докторской степени.

Официальный оппонент, д.б.н., А.Ю. Абрамов:
... по искомой специальности.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:
Спасибо большое. Дмитрий Сергеевич, прозвучал вопрос Андрея Юрьевича, ответьте, пожалуйста.

Соискатель, Д.С.Билан:
Большое спасибо. По поводу грани. Да, это, наверное, вот то, что и должно решить научное сообщество в ближайшее время, то есть вот где грань между добром и злом, пользой и вредом. И такие инструменты, они как раз помогают в этом разобраться. Вот с перекисью немножко полегче. Вот у нас в отделе инструмент, сделанный Всеволодом Белоусовым НуPer-ДААО, я рассказывал об этом инструменте, то есть к биосенсору привязывается на уровне гена фермент, который генерит пероксид водорода. И вот, собственно, с помощью такого инструмента были сделаны предположения, а сколько же внутри этого пероксида образуется. И сказать там точные цифры сложно, потому что это индивидуальность клеток накладывает тоже. Но диапазон примерно 50-100 наномолей, то есть примерно, как и Гельмут Зис в своей концепции изложил. И вот этот инструмент, хемогентику... хемогенетический активно используем в различных моделях, то есть и у нас в отделе хемогенетика тканей мозга, и мы на рыбках делаем различные хемогенетические подходы. И когда мы такой инструмент помещаем в ткани, то, как

правило, там мгновенно ничего не умирает, то есть у нас развивается патология, но ткань жива, то есть вот эта вот внутриклеточная концентрация 50-100 наномолей – это видимо уже сильный стресс, но при этом он такой, не все уничтожающий, то есть там не происходит мгновенного какого-то некроза ткани. Ну то есть, наверное, единицы наномолей это сигналлинг, десятки наномолей это такие запускаются резервы, что ткань попадает в какую-то воспаленную область. И все, что начинается от 100 и выше – это уже окислительный стресс. Что касается гипогалогенных кислот, то здесь этой грани, мне кажется, никто сейчас не скажет, где она. И мы ее активно ищем. Я уверен, что в ближайшие года два-три от нашей команды будут еще представлены диссертационные работы. Потому что мы сейчас очень так широко смотрим на вообще природу этого галогенирующего стресса, то есть мы смотрим... на самом деле даже непонятно, как вообще эти продукты ходят между разными компартментами, как они проникают. Или мы, например, добавляем их в культуру клеток, и часть гибнет мгновенно, а у части мы видим апоптоз через какое-то время. Там сложно работать с какими-то концентрациями, потому что... ну это хлорка, по сути, очень такое ядерное соединение. То есть, когда мы наливаем на клетки или куда-то закалываем, то вот все, что в этой области, оно начинает... то есть скорость реакции быстрее даже, чем оно успеваешь продиффундировать. И поэтому нужно пересчитывать моли на единицы клеток. Вот мы, например, видим, что такая вот полулетальная доза для клеток это, примерно, несколько единиц пикомолей, вот гипохлорита или гипобромита на клетку. Какие-нибудь соединения типа гипотиоционата или хлорамин, хлоротаурин, они чуть подольше это выдерживают. Ну в этом как раз и смысл разобраться. Мы сейчас и РНК секвенирование делаем, и смотрим вообще, как гипогалогенные... они же разные эти гипогалогенные кислоты, то есть у них видимо и механизмы какие-то тоже разные. Потому что почему, например, при бронхиальной астме у нас маркер гипобромит, хотя мог бы быть и гипохлорит. То есть это одни и те же гемовые пероксидазы, которые делают смесь, но почему-то при одном патогенезе превалируют одни, при другом – другие. Их воздействия, судя по всему, на живые системы разные. И я думаю, что потихонечку мы в этом будем разбираться, мы и коллеги, которые будут использовать инструмент подобного типа. Спасибо.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Андрей Юрьевич, вы удовлетворены ответами Дмитрия Сергеевича?

(получает утвердительный ответ)

Спасибо. Так, Петр Дмитриевич Брежестовский, пожалуйста, следующий официальный оппонент.

Официальный оппонент, д.б.н., П.Д. Брежестовский:

(отзыв прилагается, отзыв положительный)

Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены ученого совета... извините, пожалуйста... дорогие коллеги. Я прежде всего хочу отметить, что прочитал эту работу не только с огромным интересом, но и с большой пользой для себя. Потому что был впечатлен очень важным изложением и четкостью работы, которая была сделана. Волею судьбы мне пришлось оппонировать многие работы даже за рубежом: во Франции, Испании, Италии и даже в Австралии. Это были кандидатские диссертации, либо RDR, который соответствует докторским диссертациям. Но по качеству работы, по качеству изложения работа Дмитрия Сергеевича значительно превосходит все эти работы. На этом я в принципе мог бы и закончить свое изложение и... сказать просто положительное заключение, но поскольку это официальная процедура, то мне придется обратиться к моему отзыву, и в котором уже более детально изложено диссертационное... детали диссертационной работы. Ну прежде всего хочу подчеркнуть, что эта работа, несомненно, актуальна и важна. В последние годы бурно развивается направление редокс-биологии, и об этом уже сейчас говорили, вот, публикуется огромное количество работ, которые

посвящены исследованию активных форм кислорода. В результате кардинально пересмотрены устроившиеся, установившиеся уже ранее представления об исключительно негативной повреждающей роли. И сейчас, уже сегодня обсуждали о том, что может быть и положительная и отрицательная роль об этом. Фундаментальный прорыв в этой области был... произошло с появлением флуоресцентных белков, которые были созданы на основе биосенсоров. И создание этих биосенсоров привело к появлению ряда новых инструментов, вот, и, однако, очень многих инструментов не хватало. И вот для этого было очень важно, чтобы была сделана та работа, которую проделал Дмитрий Сергеевич. И поэтому диссертационная работа, целью которой является разработка новых генетически кодируемых редокс потенциалов на основе флуоресцентных белков, а также исследование динамики редокс-параметров в моделях *in vivo* является несомненно важной и актуальной. Востребованность работы усиливается еще и тем, что в ней сочетается, как сочетание новых перспективных биосенсоров, а также и практическое использование. Но работа изложена вообще классическим образом, вот. Но хочу подчеркнуть количество работ, которые цитируются, более 900 работ. Это огромное количество работ, этот список источников особенно впечатляет и указывает на скрупулёзность, на эрудированность и глубокие знания автора исследования. Это правда, это так сказать, меня это очень впечатлило, я очень многое узнал из вашей работы. В главе обзор литературы более подробно изложены разные типы биосенсоров, не буду на этом останавливаться. И глава является очень важной, поскольку в ней изложено много работ об устройстве и применении флуоресцентных биосенсоров. Представленная в конце обзора таблица редокс-биосенсоров является уникальным справочником, в котором указаны основные свойства, достоинства и недостатки различных биосенсоров. Эта информация может служить важным источником для научного сообщества, как справочник при выборе необходимых инструментов исследования. И это очень важно, я считаю, и нужно подчеркнуть. О высоком научно-методическом уровне выполненной работы и получению результатов свидетельствует применение широкого спектра современных методов молекулярной биологии, культуры тканей, экспрессии и анализов белков. Особенно следует выделить именно инструменты исследований и, в частности, рыбы *Danio rerio*. Потому что *Danio rerio*, о котором говорил уже Дмитрий Сергеевич, он показывал, это прозрачная рыбка, замечательная рыбка, которая развивается очень быстро. И она представляет собой очень удобную модель, которая позволяет получать много важной информации и, которая труднодоступна для млекопитающих. Я хочу почему сказать, что с особой теплотой отношусь к *Danio rerio* рыбке, потому что у меня в Париже, в моей лаборатории был тоже огромный аквариум, на котором мы работали, ставили эксперименты. И я в них был влюблен и до сих пор влюблен, это замечательный объект, который, как только есть возможность, нужно его исследовать. Я думаю, что... мне кажется, что вы первый, кто вообще ввел его в очень такую мощную экспериментальную модель в России, у нас. Я не знаю, так это или нет, но мне кажется, это так. Результаты исследования, они подробно изложены, здесь все очень хорошо, мне кажется, не буду на этом останавливаться. Хочу сказать, что... отметить масштаб, оригинальность пионерских разработок. Во-первых, был создан первый редокс-чувствительный красный флуоресцентный белок – это очень важно, потому что можно одновременно исследовать несколько компонентов одновременно, и это чрезвычайно важно. Во-вторых, важным научным достижением является создание и скрининг версий биосенсора для регистрации гипогалогенных кислот. Это тоже очень важно. И, в-третьих, созданный биосенсор Gtx-goCherry представляет собой первый в истории пример редокс-чувствительного красного флуоресцентного белка. И сделана еще и под него структура. Ну и, конечно, в-четвертых, это потому, что в исследованиях *in vivo*... проведено исследование концентрации пероксида... H₂O₂ в тканях мозга крыс на начальных стадиях развития ишемического инсульта. Вот, ну я не буду дальше просто останавливаться, хочу просто сказать, что есть несколько замечаний и вопросов. На некоторые вопросы уже были сделаны ответы, но все

равно, я все-таки хотел бы вот об этом сказать. Вот, там в диссертации на странице 186, вот касается различий характера окисления при использовании двух биосенсоров: глутаредоксин1-goKate и goCherry. Вот, вы показали, что в эукариотических клетках при использовании goKate происходит необратимое окисление, а при goCherry наблюдали обратимое изменение сигнала. Вы пишете, что это наблюдалось не по установленной вами причине. Вот я заметил, что при сравнении других более ранних рисунков, где вы говорили, вы использовали разные концентрации. Там было в пять раз, концентрации были разные.

Не может ли это быть причиной того, что необратимость... когда вы использовали очень высокую концентрацию, вы наблюдали необратимый эффект, а когда более низкая концентрация – была обратимой. Вот, и также вот к этому относится еще страница 189, где текст гласит, мы подтвердили, что белок goCherry действительно не чувствительный к H₂O₂, вплоть до высоких концентраций 500 микромолей. И в этом случае непонятно, вы пишете... как это согласовать с результатом, представленным на рисунке, более раннем рисунке 42, и вы показывали этот слайд, где наблюдались большие ответы при аппликации 150 микромолей – более низкой концентрации H₂O₂. Я думаю, что это, наверное, может быть ошибка изложения или... не знаю, как вы это объясняете. Потому что, дело в том, что из концентрационной зависимости, которую вы получали, у вас там IC50 где-то примерно, где-то меньше 150 микромолей, понимаете, более низкие концентрации... Другие вопросы, которые у меня были, на них уже... были другие вопросы, вы задавали вопросы, как раз я поэтому на этом не буду останавливаться. Просто, хочу как бы сказать, что приведенные замечания или вопросы не носят принципиального характера, не уменьшают значимость полученных результатов, не отменяют превосходного впечатления от диссертационной работы, не снижают ее высокую оценку. Исследования действительно замечательные, автореферат написан ясно, информативно, хорошим литературным стилем и полностью отражает основное содержание диссертационной работы. Таким образом, диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича, отвечает всем требованиям, установленным положением о присуждении ученых степеней, а ее автор, Билан Дмитрий Сергеевич, несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности молекулярная биология.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо большое, Петр Дмитриевич. Так и хочется сказать, Дмитрий Сергеевич, защищайтесь. Ответьте, пожалуйста, на вопросы прозвучавшие.

Соискатель, Д.С.Билан:

Спасибо большое, Петр Дмитриевич. Засмущали меня очень, меня сложно смутить, ваш отзыв конечно... Я очень тронут и очень ценю. Что касается ответов по красным белкам, где мы сравнивали разные концентрации вот на этой картинке. Надо сказать, что в диссертации я изложение делал таким образом, что как будто бы мы все делали параллельно. На самом деле goKate мы делали, там, несколькими годами раньше, потому что мы брали один белок - бросали, потому что он не получался, что-то оптимизировали. Поэтому показательные картинки где-то разные. Но, конечно же, goKate был протестирован и на более низкие концентрации. И здесь мы добавляли более высокую концентрацию еще и потому, что у goKate редокс-потенциал примерно -240 милливольт, против goCherry -310, то есть он более сложно окисляется, поэтому мы добавляли побольше, чтобы найти ответ повыше. Ну, естественно, мы пытались идти в более низкую сторону и более того, мы пытались ждать, то есть это несколько часов, но вот такая динамика... ну то есть он необратим. То есть я могу совершенно точно сказать, что его можно использовать как сенсор памяти. Что в принципе тоже преимущество. То есть можно представить систему, где у нас произошло окисление, а дальше нам нужно

получить, например, срезы мозга. И вот с другими сенсорами – они быстро восстанавливаются, то есть пока мы делаем какие-то операции уже все – все восстановилось. А здесь получается, то, что в живой системе раз окислилось, оно это окисление запоминает. То есть мы можем позиционировать это так. Что касается вот чувствительности то на пероксид, то на глутатион. Здесь ошибки нет. Возможно, как-то я неудачно изложил немножко. Вот, собственно, да, вот этот график. Когда мы говорим об окислении, то есть тут нужно понимать, что за система. То есть, например, если мы берем выделенный белок и льем на него пероксид, то никакого окисления не будет. Вот здесь, например, вот эти вот кривые – это динамика, мы смотрели в кювете с очень небольшим временным интервалом, то есть как со временем окисляется сенсор. Вот, вот эта вот, не знаю какого цвета... голубого, линия – мы добавляем к 40 наномолям избыток пероксида, 10 микромоль, и ничего не происходит. Добавляем больше – тут даже мы наблюдаем выгорание, но это уже эффект не специфика. Во-первых, мы постоянно светим очень долго, 10 минут, и концентрация большая, но изменений нет. А на глутатион на окисленный есть. И вот те примеры, где мы добавляем перекись – это на самом деле опосредованный эффект. То есть мы добавляем перекись, чтобы качнуть редокс-статус пула глутатиона в окисленную форму. То есть у нас глутатион это главный редокс-буфер, поэтому добавить, например, там, какой-нибудь другой окислитель – первое, что реагирует, это глутатион. То есть вот эта вся машинерия, глутатион пероксидазы, вся глутатион-зависимая система начинает работать, поэтому глутатион, он качается в сторону окисления... сенсор качает не напрямую пероксид, а опосредованно через это окисление. Потому что нам нужно было воздействовать на глутатион, и вот любой сильный окислитель такое воздействие нам дает. Поэтому ошибки здесь нет. Возможно, нужно было более как-то наглядно. И диссертация у меня довольно большая, я всячески старался экономить место, и какие-то лишние графики, может быть, здесь были бы к месту. Простите, если немножко смутил этим. Спасибо.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Петр Дмитриевич, ответил Дмитрий Сергеевич на ваши вопросы?

(получает утвердительный ответ)

Все, спасибо большое. Так, Александр Павлович Савицкий, пожалуйста. Отзыв официального оппонента.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:

(отзыв предлагается, отзыв положительный)

Уважаемый председатель, уважаемые коллеги. Ну в этом зале я выступаю в первый раз, но, вообще то говоря, на этом ученом совете, я выступаю неоднократно. И я всегда с большим интересом берусь рецензировать и анализировать работы, которые вышли из некогда очень большой известной лаборатории Сергея Анатольевича Лукьянова, которая сейчас, конечно же, дифференцировалась на много других структурных подразделений. И мне всегда были эти работы интересны, прежде всего тем, что они отличались очень глубокой биологической проработкой, биологической задачей. Дело в том, что... вот в настоящее время, конечно, такой этап, когда многие низкомолекулярные соединения, которые раньше рассматривались, ну просто, уже говорилось, либо просто как токсичные, либо просто как побочные продукты, вдруг начинает выясняться, что они играют какую-то регуляторную роль. И необходимо анализировать их концентрации, особо малые концентрации. Ну вот один из таких примеров, конечно, это вот гипохлорит. И, конечно же, любому химику, когда он слышит, что там активировалась миелопероксидаза и пошел гипохлорит, то все, всякому, кто с ней столкнулся, пришел конец. Вот, и в силу множественности мишеней, даже не пытались анализировать, что в общем-то происходит. А вот, конечно же, работы последних лет, удивительно, когда выяснилось, что некоторые микроорганизмы, они знают, чем их будут атаковать, они так отобрались. Оказалось, у

них есть транскрипционные факторы, которые реагируют на гипохлорит и способствуют развитию ответа – блокады, атакой гипохлоритом. И вот, одна эта, простейшая в данном случае была использована *E.coli*, из *E.coli* был выделен такой транскрипционный фактор и на основе него, в общем-то, я прежде всего говорю о той части, которая меня больше всего удивила, был создан вот это вот сенсор *Nurocrates*, вот. И вот такая детальная логическая... логически даже детальная проработка биологической проблемы, биологической части проблемы, она всегда вот отличала все вот эти вот работы, которые мне так многократно приходилось рецензировать. В этой работе, конечно же, очень много пионерских моментов. Здесь уже часто многие вещи отмечались. Отмечалось и то, что многие из сенсоров вообще получены впервые, это пионерские работы, как, например, на гипохлорит. Другие были существенно модифицированы и позволяют провести многоцветное измерение, ну, например, получение красных сенсоров, которые вначале получались чисто зеленые, были желтые, потом получали красные. Это очень существенное достижение, которое действительно делает возможность проводить мультипараметрические измерения, наблюдать не за одним параметром, а сразу за несколькими. И, чтобы я еще хотел особенно отметить, что, конечно же, группа сенсоров, которая была создана, вот, они, в общем-то, позволяют, в общем-то, взглянуть на биохимию живых клеток, живых организмов совершенно с другой позиции, с другой точки зрения. Если дальше можно, допустим, измерять просто редокс-потенциал клетки, ну, в принципе, не Бог вещь какая сложная задача, но дело в том, что понять биохимию, за счет чего он развивается, какие пары играют существенную роль, теперь мы получили реальный инструмент. Например, на глутатион, на эту пару и целый ряд других параметров. Конечно, вообще-то говоря, вот те методы, которые разработаны, что бы я еще хотел подчеркнуть, вот в этой работе... Те методы, которые разработаны в этой работе, они на самом деле, к сожалению, намного опережают возможности состояния нашего приборостроения как в стране, так и в мире. И поэтому элегантный переход на *Danio rerio* – это произошло не от того, что аквариум красивый. Я согласен, аквариумы я тоже люблю. А из-за того, что этот объект резко упрощает инструментальные измерения, и поэтому вот автор очень элегантно использовал этот прием и, действительно, многоцветность, реально показал, как эту многоцветность можно продемонстрировать на, по крайней мере, при решении части тех задач, которые... ну, в настоящее время есть в современной биохимии. Ну и в целом, конечно же, было сказано достаточно хвалебных слов, я могу ко всему этому только присоединиться ко всей этой работе, тем более что частично разные этапы этой работы мне на разных этапах приходилось знакомиться, рецензировать. Но вот я бы хотел сказать, такой вот в конце заключения, несколько вот замечаний и пожеланий, которые скорее так вот, они пожелания, я их неоднократно высказывал. Но, по-видимому, есть какие-то проблемы и причины, почему это... до сих пор прогресса какого-то нет в этом направлении. Ну, например, вот мой классический вопрос, поскольку все знают, что я работаю не просто с флуоресцентной спектроскопией, а предпочитаю флуоресцентную спектроскопию временного разрешения, то у меня сразу же возникает вот вопрос. Что создана целая палитра прекрасных сенсоров, вот, которые великолепно работают, но поскольку мы тоже занимаемся этими вещами, при длительных измерениях на живых организмах, если вы затяните измерения на несколько дней, недель или месяцев, то очень высокий риск артефактных измерений на... при измерении интенсивности флуоресценции. Потому что очень много параметров будут влиять на интенсивность флуоресценции. В связи с этим, у меня, конечно же вопрос, почему вот не анализировалось - временной домен. Я могу, ну, по крайней мере, для части сенсоров, тут более ли менее понятна причина... механизм, как они работают, это за счет циркулярной пермутации меняется равновесие, меняется рК между протонированной и депротонированной формой хромофора внутри белка. Вообще-то говоря, это два разных конформационных состояния. И понятно, что, если мы будем возбуждать на одной длине волны, на другой, мы даже чисто теоретически обязаны увидеть разницу. Потому что при

возбуждении протонированной формы, у нас примешивается перенос протона. Эта вещь очень чувствительная, особенно, когда это находится в таком жестком белковом окружении. И нужно еще понимать, куда переносишь протон, это должно было проявиться. И вот этот вот механизм, как мне кажется, вот внимательное изучение временного домена, они позволили бы повысить надежность этих сенсоров, которые без всякого сомнения, они востребованы, и они необходимы. Второй вопрос у меня также, в общем-то, отчасти связан с первым вопросом. Вот были получены прекрасные рентгеноструктурные картинки, не важно в соавторстве с кем, сенсор то разработан, в общем-то здесь, вот. И была получена довольно детальная картина рентгеновская. И вот вообще, у меня, конечно, вопрос почему, в общем-то, не удалось на основе вот этих вот прекрасных рентгеноструктурных данных попытаться улучшить параметры сенсора? Потому что, в общем-то, динамический диапазон для некоторых из них, он довольно мал, в то время как для других, построенных на этом... ну, те, которые описаны... в то время как для других, которые разработаны, там, где динамический диапазон ответа существенно больше – это разы, пять-шесть раз. В то время как здесь, там, где-то полтора-два раза, динамический диапазон. И поэтому вот насколько возможна рациональная стратегия, рациональный мутагенез на основе вот этих рентгеноструктурных данных? Отчасти, вот это как раз перекликается с дискуссией, которая здесь уже поднималась, по этому поводу. И частично, в общем-то, ответ уже был дан. Вот, и еще один, последнее замечание у меня. Конечно же, вот, когда мы наблюдаем динамику ответа – ну, это самое легкое, особенно когда делается по интенсивности. Но если у вас есть радиометрический сенсор, то всегда хотелось бы, конечно, перевести это в количественные данные, количественные параметры, не просто в динамику ответа, а количественные параметры. Поэтому вот возникает вопрос, особенно, когда говорится о том, что там очень низкая концентрация перекиси водорода, то хотелось бы понять, а что это вот в цифровом значении, как это может выглядеть, какие это цифры. Ну, собственно говоря, это вот все мои такие вот размышления, замечания. Хотя, конечно же, вот прежде всего, что, как сказать, бросается в глаза, при ознакомлении с этой работой, что, в общем-то, именно благодаря работам в значительной степени Дмитрия Сергеевича, так сказать, создано практически новый, принципиально новый сенсор на гипохлорит. Я думаю, что у него очень большое будущее, вот, и мы уже с интересом пытаемся приспособить этот сенсор для своих целей. Но это было после предыдущей защиты, Костюка, вот. Потому что действительно в выработке и часть загадок с некоторыми бактериями, почему они так эффективно блокируют всю систему иммунитета, оно может быть связано с тем, с разгадкой, как работает вот этот вот окислительный стресс. В данном случае, почему атака гипохлорита не проходит и как можно активировать механизмы. И поэтому, конечно же, у этой работы... это только, я бы сказал, начало, большое будущее, развитие. И, бесспорно, Дмитрий Сергеевич создал принципиально новое направление вот работ в этой области. Поэтому я могу зачитать, вот тут... всякие замечания... бумажки... номера, которые нужно, но они есть в отзыве.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Ну они в официальном отзыве есть, можно и опустить.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:

Да, поэтому я скажу официальные слова, что с моей точки зрения, работа бесспорно заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Александр Павлович, спасибо большое. Дмитрий Сергеевич, опять надо. Пожалуйста, ответьте оппоненту.

Соискатель, Д.С.Билан:

Спасибо, Александр Павлович. По поводу подходов FLIM. Конечно, замечательный метод. И мы тоже с интересом на него смотрим, потому что и количественный анализ, и независимость от концентрации, от интенсивности, например. Но мы, как и, наверное, многие области люди в области, ждем, когда эти приборы станут более доступными, станут рутинными, подешевеют. Потому что... ну вот первый раз я с такой установкой столкнулся, когда был на стажировке в Германии, мне казалось, что это просто какой-то космос. В России как-то много лет я даже и не знал об этом. И сейчас вот постепенно, я вижу, что этот метод все больше применяется, то есть как минимум несколько лабораторий в Москве уже этот подход используют. И поэтому, мы это не проверяли, просто потому что у нас оборудования такого нет. Но вот наши коллеги они повсеместно тестируют наши сенсоры. Вот я, например, могу сказать, что протестирован HyPer, разные версии, 1,2, 3, 7. И они работают во FLIM. Другие редокс-биосенсоры протестированы, например, Peroxox на НАД/НАДН или те же варианты roGFP. И мне эта область вообще интересна, потому что, мне кажется, что в принципе, можно придумать, как делать сенсоры именно для FLIM режима. То есть как мы делаем мутагенезы, делаем скрининги и вот точно также, наверное, их можно отбирать по времени жизни. Вот хотелось бы, например, понять вообще есть там какая-то закономерность или нет. Потому что, вот, например, HyPerRed во FLIM не работает, то есть время жизни не меняется при окислении. При этом версия, полученная из HyPerRed одной мутацией, получился биосенсор SypHerRed на рН, во FLIM он прекрасно работает. То есть там много интересных закономерностей и по идеи, вот взять бы их все вместе, протестировать на разных ядрах, на разные окислители. Я думаю, что в будущем такие работы будут сделаны не нами, так нашими коллегами, у кого доступ к такому оборудованию есть. По поводу второго вопроса. Да, собственно, была дискуссия по поводу можем ли мы улучшить или не можем. Я ответил, что это такой полурациональный / полуслучайный подход. Ну вот я тут анонсирую, Нурocrates вторую версию. Вот черненьким – вот так выглядит первая версия. Вот настолько у нее... то есть весь мой рассказ был про версию, которая отвечает вот так, на фоне того, что у нас сейчас в закромах лежит. Вот эта красная версия – улучшенная. И там две мутации, то есть одна мутация действительно расположена вот в той же области возле этого вот аспарагина, который состыкован с консервативным остатком во флуоресцентном белке, который участвует в переносе протона. А второй остаток, он совершенно странный, он находится где-то в области, которая отвечает за димеризацию. И вот придумать, внести туда мутацию, и какую мутацию – это вот совершенно было бы невозможно. То есть мы покопались вот в районе, где нам казалось должны быть какие-то видимые изменения, что-то поймали, а случайным мутагенезом мы все равно добрали вот что-то совсем далеко от места событий. Но опять же повторюсь, что вот чем больше у нас будет информации о структурах таких белков, чем больше будет в принципе биосенсоров, я думаю, что эти закономерности, они будут появляться, и мы будем больше уходить в сторону рационального дизайна, потому что это, конечно, гораздо эффективнее. Хотя сенсоры ведь можно делать, отталкиваясь от разработки и улучшения подходов скрининга, то есть если мы делаем удобными скрининги. Например, сейчас мы можем, ну проверять реально тысячи клонов. То есть может быть даже это проще – проверить тысячу клонов вот таким удобным способом, отбирая по какому-то заданному нам параметру, нежели чем поштучно перебирать какие-то позиции. Ну, не знаю, мы пытаемся комбинировать и так, и так. Что касается откалибровать пероксид водорода, чтобы сказать о каких-то конкретных цифрах. Здесь, к сожалению, это сложно сделать. Вот в диссертации, я в презентации не показал, как мы еще анализировали ацидоз. И мы, например, там до единиц определили... до десятых и, можно сказать, даже до сотых определили, как меняется рН в различных компартментах при инсульте. Потому что этот параметр, он стабильный, то есть можно сделать калибровочные кривые и по... растриваться по клеткам, по тканям, например. Что

касается вот такой высокорепактивной химии, например, то здесь очень сложно сделать какие бы то ни было калибровки. Потому что, ну вот мы добавляем, например, к какому-то биологическому объекту пероксид, и он мгновенно начинает реагировать не только с сенсором, то есть он реагирует и с мембраной, реагирует с огромным количеством мишеней. Поэтому сколько вот именно этого пероксида дошло до самого сенсора – понять сложно. И поэтому этот метод он скорее такой – полуколичественный. Есть работы, где определяли градиент пероксида, ну вот, например, он составляет 650-700 крат вот через мембрану. То есть нужно в 600-700 раз налить снаружи больше, чтобы внутри оказалась желаемая концентрация. Но опять же, разные типы клеток. А если это ткань, то это совсем такая мешанина получается. Поэтому это метод – полуколичественный, но благодаря подходам хемогенетики, как я уже Андрею Юрьевичу отвечал, мы можем оперировать каким-то диапазонами. То есть мне кажется, что мы как раз крутимся в районе десятков наномолей. И, собственно, когда мы работали с моделью инсульта, мне вообще сначала казалось, что вот мы... ну представьте это *in vivo* модель, а дальше мы в голову вставляем оптические волокна, то есть это само по себе может уже вызывать воспаление. Мы никогда не смотрим в острой фазе, то есть мы смотрим, там... через месяц, а то и больше. И у меня, например, было ощущение, что вообще все это не получится, потому что мы влезли, сделали просто краниальное окно, вмешательство в ткань. И поэтому мы работали на *ex vivo*, делали какие-то пристрелки. И вот, собственно, когда мы доставали мозг и подводили волокно к этой светящейся зоне, то есть просто из-за контакта ткани мозга с окружающей атмосферой, у нас уже сенсор начинал мгновенно окисляться. И мы его титровали, этот сенсор, внешними концентрациями, как примерно вот здесь, то есть это сделано *ex vivo*, чтобы понять, где этот потолок. И вот, к удивлению, этот потолок, он плюс/минус совпал с пиком, который мы наблюдаем при инсульте на следующие сутки. То есть на основе этого я могу с уверенностью сказать, что в острой фазе действительно, если пероксид и образуется, то это скорее какие-то десятки наномолей. А когда патология развивается, да, наступают следующие сутки – там может быть что угодно, то есть это явно сотни наномолей и больше. Но там наш сенсор находится в максимально окисленном состоянии. И здесь еще можно сделать комментарий, что вот эта перекись, которую мы видим на следующие сутки, это вообще, скорее всего, вторичное явление. То есть мы ожидали это увидеть в астроцитах, в нейронах с первых же минут ишемии, например. Но видим вот такой многочасовой градиент. Возможно, что этот пероксид надо искать в активированной микроглии, которая отвечает на воспаление, вызванное инсультом. Или гематоэнцефалический барьер ломается, и начинается инфильтрация нейтрофилов в ткань мозга, и они могут это тоже делать. То есть все эти события, они, возможно, не имеют отношения вообще к этому начальному очагу. Поэтому начальные стадии – десятки наномолей, поздние стадии патологии – от ста и больше. Думаю, что там и до микромолей может достигать. Кажется все.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Александр Павлович, удовлетворены ответами соискателя?

(получает утвердительный ответ)

Спасибо. Коллеги, мы начинаем открытую дискуссию по работе Дмитрия Сергеевича Билана. Кто хотел бы выступить в рамках дискуссии? Да, пожалуйста. Александр Габибович.

Д.х.н., академик, А.Г. Габибов:

Да, ну диссертация настолько подробно разобрана замечательными оппонентами и институтом, возглавляемым член-корреспондентом Лагарьковой, что не нуждается в детализации. Я просто давно слежу за работами Дмитрия Билана, и вот сейчас на конференции постгеном. И его ученики уже, и Севины ученики интегрированы естественным путем. Но мне кажется, что в этой работе сделано самое главное – показано,

что, об этом сказал Александр Павлович, что можно действительно следить за ситуацией *in vivo*. Да, есть вопросы к нормировкам, к количественной, так сказать, интерпретации данных. Они были и у Севы, я тогда выступал. Но это прорыв в подсматривании, что делается в клетке. В данном случае в оксидазной системе, вот. Но мне кажется, что это очень важный этап. Очень приятно, что в институте появляется, я в этом не сомневаюсь, новый молодой доктор наук. И мы всячески будем Диму приветствовать и способствовать. Я призываю всех проголосовать за, спасибо.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Александр Габибович. Коллеги, кто еще хотел бы что-то сказать. Ну вот, Всеволод Вадимович, научный консультант работы.

Д.б.н., член-корреспондент, научный консультант В.В. Белоусов:

Мне можно?

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Нет...наоборот приветствуется.

Д.б.н., член-корреспондент, научный консультант В.В. Белоусов:

Добрый день, уважаемые коллеги. Ну, я не случайно задаю вопрос, потому что я регламента не очень знаю, потому что мой первый доктор наук, который защищается под моим руководством, вот, ну сложно...

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Не руководством, не руководством...

Д.б.н., член-корреспондент, научный консультант В.В. Белоусов:

Под моей конс...под моей..консул..надзором. Ну и довольно сложно, так вот сходу говорить что-то про эту работу, потому что мы действительно, уже сколько, пятнадцать лет работаем бок о бок. И это, ну такое уже взаимодействие, такое рутинное. Сейчас приходится действительно как бы осмыслять то, что сделано глобально. Но действительно, я могу сказать, что... все детали по науке уже данной работы более ли менее сказаны. Но я могу сказать, что я работаю, так или иначе, со многими зарубежными коллегами, которые тоже... в том числе там инсульт моделируют, в том числе работают с zebrafish и так далее. И конечно то, что делает с этими моделями *in vivo* – это технологически абсолютно недостижимый сейчас уровень для, значит, наших коллег. Которые смотрят на это, честно говоря, с широко раскрытыми глазами. И я думаю, что действительно Дмитрию удалось построить эти все *in vivo* модели. И я вот... наше взаимодействие оно всегда так строилось, примерно, что я приходил, говорил Дим, слушай, надо, наверное, нам zebrafish как бы сделать или, там, надо нам, например, запустить модель инсульта, как бы, да. И я, честно сказать, в виварий ни разу не зашел, как бы, да. И на само деле Дмитрий всегда умел эту работу взять, организовать, соответственно, и вывести это совершенно самостоятельно с помощью своих сотрудников уже на совершенно вот этот недостижимый технологический уровень, который эти работы сейчас демонстрируют. Потом, ну действительно, если говорить про гипогалогенный стресс и сигналинг, это тоже, то что, не то, что сделано впервые, а фактически как в девяностых годах когда-то приоткрылась дверца в редокс-сигналинг, когда стало понятно, что пероксид может быть сигнальной молекулой. И был такой, ну он, по-моему, и здравствует, слава Богу, ученый Су Гари, который пытался эту статью опубликовать в Nature, Science там и так далее. И все крутили у виска, говорили, ну ты что родной, как бы, это же токсичные молекулы, что ты со своим сигналингом. А сейчас это известное, как бы, поле – ни у кого сомнений не вызывающее. И то же самое сейчас на

наших глазах происходит с активными формами галогенов. И соответственно мы сейчас вот ну, фактически, в том же положении находимся, как вот коллеги Су Гари, которые смотрели на все эти молекулы и говорили, как это может быть какой-то сигнал, а какая вообще биология, а какая химия их взаимодействия – никто ничего не знал. Поэтому, в общем, эта работа, она, конечно, открывает...открывает двери в общее в новую совершенно область, новую химию, биохимию. Вот, ну и, как бы, наконец такой парадоксальный, как бы...парадоксальный момент, который заключается вот... наши вообще годы работы в ИБХ, Лукьяновская группа, потом отдел, потом наши все группы, в общем-то, всегда работали с флуоресцентными белками, с сенсорами и так далее. И вот был вопрос Александра Павловича, а чего не FLIM? А действительно, а что не FLIM? Как бы, да. Но у нас нет FLIM микроскопа. И на самом деле, те... нет, ну я имею ввиду в ИБХ. Вы же понимаете, рыбка, вот рыбка, она плавает, вам хочется ее взять за хвост, положить под микроскоп и померить, а не везти ее там в другой институт. И я могу сказать, что, на самом деле, работы... вот эти системы фотонные были построены в МГУ вместе с Димой, Сашей Ланиным, Желтиковым. Ну, потому что, на самом деле, нам здесь не на чем работать. Лукьянов, когда купил дешевый конфокальный микроскоп, самый первый в России за нал, но все тоже крутили как бы пальцем у виска. Реально до сих пор где-то стоит этот микроскоп. Вот, на самом деле, мы сначала, как бы, такие...ну всегда думали, ну как вот, здесь такие покупаются масс-спектрометры, ЯМР-спектрометры, которые в этом институте, и никогда микроскопии не уделялось внимания такого вот, какого заслуживает уровень этих работ, Лукьянова, потом его учеников. Я там все работы делал в EMBL на флуоресцентных белках, мы сенсоры делали здесь, в EMBL ездили снимать на хороших микроскопах. Но парадоксальным образом случилось так, что я понимаю сейчас, что если бы у нас, если бы мы были оснащены по микроскопу и упакованы так, как наши коллеги в EMBL, на самом деле не появились бы вот эти все мультифотонные установки, которые, значит, с Желтиковым и с Ланиным сделали. И те, действительно, результаты, которые уникальные были получены, они бы не были, на самом деле, получены на коммерческих машинах. Вот, ну вот здесь вот тоже заслуга Дмитрия, что он выстраивает всегда эти отношения и с Ланиным, и с Надеждой Браже, и в общем получают такие сплавы, которые на самом деле крепче, чем зарубежные сплавы. Вот. Поэтому я призываю тоже голосовать за эту работу, она очень достойная. Спасибо.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Всеволод Вадимович. Да, голь на выдумки хитра, это точно. Коллеги, есть еще желающие выступить, но уже сказано тут много и так детально обсудили. Не вижу, не вижу. Тогда заключительное слово, Дмитрий Сергеевич, вам предоставляется.

Соискатель, Д.С.Билан:

Я постараюсь кратко, насколько это возможно, потому что чувствую, что уже по времени все устали. Прежде всего спасибо всем присутствующим в зале. Спасибо, что выслушали, спасибо за вопросы. Отдельное спасибо моим оппонентам, Абрамову Андрею Юрьевичу, Брежестовскому Петру Дмитриевичу, Савицкому Александру Павловичу – вы специалисты высочайшего, мирового уровня. И ваши комментарии, рекомендации – это большая часть, вот без пафоса, большая честь взаимодействовать с вами, слушать ваши отзывы. Спасибо. Хотел бы сказать о коллабораторах, потому что докторская диссертация – это всегда сплав взаимодействия разных людей. И соответственно не было бы и работы, и диссертации, если бы не были налажены эти взаимодействия. Это огромный коллектив вообще Института биоорганической химии, потому что мы взаимодействуем и с разными людьми из каких-то бывших подразделений Сергея Анатольевича Лукьянова. И очень сейчас у нас хорошие взаимодействия, такой творческий союз с Надеждой Браже и со всем отделом Алексея Семьянова. Владимиру Александровичу большое спасибо за ваши Рамановские установки. Я думаю, что настолько перспективный метод в комбинации с

нашими инструментами, очень многое еще предстоит нам узнать, открыть. Андрею Гороховатскому, который вообще нам преподавал какие-то азы работы с флуоресцентными белками. Мише Баранову, который, мне кажется, может синтезировать абсолютно любую штуку, какую только не закажи. Вот, собственно, наш Nurocrates мы калибровали вот этими неуловимыми соединениями, которые нам синтезировал Миша. Я говорю большое спасибо в целом отделу метаболизма и редокс-биологии, который возглавляет Всеволод Белоусов. Олегу Подгорному за дискуссии о науке и не только о науке, о жизни. Большое спасибо нашим коллабораторам из МГУ, о которых мы много говорили. Это Алексей Желтиков, и сейчас активное взаимодействие с его учениками, у которых уже свои группы., Илья Федотов, Александр Ланин. Взаимодействуем с кафедрой биохимии, Алексей Катруха и Дарья Серебряная. Благодарим наших зарубежных коллег. Это прежде всего Jorris Messens и его команда из Бельгии, мы работаем. Даже сейчас в этих сложных ситуациях получаем весточки, как они тестируют какой-нибудь очередной наш сенсор и пытаются расшифровать структуру. Sophie Vrız из Франции, собственно, по ее макету ее лаборатории мы перенимали опыт, как вообще работать с zebrafish. Также институт ВНД в лице Павла Милославовича Балабана и Анастасии Бородиновой. Первые вот вирусы были получены с их помощью. А сейчас я хочу поблагодарить Александра Мощенко, который работает в центре мозга у Всеволода Белоусова, собственно, все эти красивые картинки на грызунах, они были получены благодаря тому, что у нас доступ к очень хорошему качеству аденоассоциированных вирусов, которые вот готовит Саша Мощенко. Собственно, команда. Моя команда. Многие люди, соответственно, прошли через наш коллектив, он хоть и молодой, но тем не менее много ребят. Я говорю большое спасибо тем. С кем мы прошли определенный этап пути, с кем-то мы продолжаем идти. И вот я хотел бы выделить нескольких людей, потому что в команде все равно есть люди, которые являются такими основными локомотивами. Это Арина Шохина за ее красные флуоресцентные белки. Сейчас... Арина была как раз моей первой аспиранткой, она кандидат наук, сейчас у нее своя самостоятельная успешная группа. Саша Костюк, который тянул проект по Nurocrates, это очень сложный сенсор, и химия эта сложная. И вот благодаря Саше родился не просто Nurocrates, а уже целая линейка таких инструментов. И я верю, что мы еще много что сделаем. Настя Панова и Настя Сергеева, вот, собственно, на двух вот этих девушках на протяжении всего вот этого периода держалось наше zebrafish фасилити. То есть с Настей Пановой мы в принципе его строили, а потом, когда наступили трудные времена вот Настя Сергеева, она это все подхватила, удержала и сделала еще лучше. Илья Кельмансон, Даша Котова, Саша Иванова, ну вот в особенности Илья Кельмансон, потому что именно с ним мы ставили всю экспериментальную хирургию, то есть все вот эти вот краниальные окна, имплантации волокон, инсульты – все это мы делали вместе. Ну и конечно же я хочу сказать спасибо своему учителю Всеволоду Белоусову. Человек большого ума, и сердца. И он в принципе меня научил, что в любых условиях, даже самых тяжелых, можно и нужно работать хорошо. Ну и соответственно моя семья. Большое спасибо за поддержку, за любовь. Работа ученого, она часто напоминает такого, работу вахтовика. Ну не знаю, по крайней мере, вот у меня так. И, собственно, мое спасибо за понимание этого процесса. Ну и в принципе благодаря институту, благодаря науке, я вот жену нашел в этих стенах. Поэтому, я считаю, что это самое большое везение в моей жизни, поэтому большое спасибо ИБХ. Наверное все. Спасибо.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Так, уважаемые коллеги, для проведения тайного голосования нам необходимо утвердить состав счетной комиссии. Вот, предлагается, Лебедев Юрий Борисович, члены комиссии, Шапаронов Михаил Иванович и Олейников Владимир Александрович – председатель комиссии. Нет ли возражений, кто за этот состав. Против? Воздержался? Нет. Единогласно. Тогда мы приступаем к тайному голосованию. Но просьба не уходить

членов диссертационного совета, да у нас еще второй вопрос, <не имеет отношения к данной защите>. Так, пожалуйста, мы тогда начинаем голосование, просьба получить бюллетени (*идет тайное голосование*).

Так, коллеги, счетная комиссия завершила работу, и Владимир Александрович сейчас огласит результаты тайного голосования.

Уч. секретарь, д.физ.-мат.н., В.А. Олейников:

Так, значит, слушалась диссертация, Билан Дмитрий Сергеевич. Счетная комиссия. Присутствовало на заседании 21 член нашего диссертационного совета. Роздано бюллетеней 21, оказалось в урне – 21, «За» – 21. «Против» и «Недействительных» – нет.

Зам. председателя, д.физ.-мат.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Владимир Александрович. Нам необходимо проголосовать за утверждение заключения счетной комиссии. Кто, за то, чтобы принять заключение? Против? Воздержался? Принято единогласно. И, наконец, у всех есть проект заключение диссертационного совета по работе Дмитрия Сергеевича Билана. Есть ли, коллеги, у кого замечания? Вот Николай Владимировича Бовина нет, у него обычно бывают корректировки. Ну вот... Нет ни у кого комментариев, замечаний по проекту заключения? Не вижу, тогда предлагается утвердить проект заключение по диссертационной работе. Кто за? Против? Воздержался? Принято единогласно. Ну и, наконец, разрешите тогда поздравить Дмитрия Сергеевича Билана с успешной защитой. Спасибо. Мы исчерпали повестку дня нашего заседания, коллеги всем большое спасибо, членам совета и присутствующим, до свидания.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

