



МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
(МГУ)

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ  
БИОЛОГИИ ИМЕНИ А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

Ленинские горы, Москва, 119234

Телефон: 939-53-59, Факс: 939-31-81

10.02.2020 № 35-20/203-03

На № \_\_\_\_\_

### Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу **Шохиной Арины Геннадиевны** «Генетически кодируемый индикатор для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка mCherry», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология – 03.01.03.

Редокс-биология является сейчас чрезвычайно востребованной областью исследований для самых разных биологических и медицинских специальностей. Окислительно-восстановительные реакции являются не только основой биоэнергетики клетки, но и регулируют множество сигнальных функций, определяя реализацию сигнальных каскадов, модуляцию работы ферментативных систем и зачастую определяя судьбу клетки, а конечном счете и организма. Огромное количество работ демонстрируют роль окислительного стресса в развитии очень многих, если не большинства патологий. С другой стороны, все больше исследователей обращает внимание на то, что противоположное состояние, характеризующееся как восстановительный стресс, также негативно сказывается на функционировании клеток.

В этой связи огромное значение в биологии и фундаментальной медицине приобретают методы детекции таких состояний, как в исследовательских целях, так и для диагностики. На данный момент большинство экспериментальных работ, касающихся определения редокс статуса клетки и состояния различных антиоксидантных систем и редокс-буферов, используют различные химические зонды, с той или иной степенью специфичности реагирующие с различными целевыми молекулами в клетке (перекисью водорода, перекисями липидов, глутатионом, супероксидом и т.д.). Однако, известные ограничения применения химических соединений для детекции изменений в редокс балансе диктуют необходимость поиска других подходов к данной проблеме. Одним из перспективных направлений в подобной детекции является использование генетических конструкторов, кодирующих флуоресцентные белки с детерминированной чувствительностью к тем или иным соединениям или состояниям клетки.

Работа Шохиной А.Г. посвящена разработке одного из таких перспективных генетически-кодируемых зондов, а именно индикатора для регистрации редокс-статуса пула глутатиона на основе красного флуоресцентного белка mCherry. Хотя подобный зонд существует на основе зеленого флуоресцентного белка, разработка зонда, обладающего флуоресценцией в красном спектре обладает рядом преимуществ. Помимо того, что для биологических исследований часто критически важно иметь флуоресцентные инструменты, обладающие различными спектрами возбуждения и эмиссии, длинноволновые зонды обладают преимуществами за счет более высокой проникающей способности, а значит возможности микроскопического изучения не только поверхностных, но и более глубоко лежащих тканей.

Диссертационная работа Шохиной А.Г. составлена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, методологического раздела, экспериментальной части, результатов, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы. Работа проиллюстрирована 30 рисунками, текст написан хорошим научным языком и содержит лишь небольшое количество опечаток и стилистических шероховатостей.

В обзоре литературы автор всесторонне рассматривает современные представления о роли глутатиона в клеточном метаболизме, подробно останавливается на ферментативных системах антиоксидантной защиты и методологических подходах, которые в настоящее время используются для детекции разных форм глутатиона.

Следующий раздел посвящен методам, которые Шохина А.Г. применяла в ходе выполнения диссертационной работы. Точность, логика и полнота их описания позволяют заключить, что все они могут быть воспроизведены на практике. Многообразие и современность использованных техник свидетельствует в пользу высокой квалификации автора работы.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертации, оригинальны, описаны соискателем последовательно, каждая глава сопровождается обоснованными выводами. Шохиной А.Г. был создан красный генетически кодируемый индикатор 2GSH/GSSG соотношения Grx1-roCherry, на препарате очищенного белка были описаны некоторые его спектральные характеристики, амплитуда ответа, pH-чувствительность, окислительно-восстановительный потенциал. Также была оценена чувствительность Grx1-roCherry к наиболее часто встречающимся внутриклеточным окислителям. Grx1-roCherry был успешно применен в разных клеточных моделях в комбинации с другими генетически кодируемыми индикаторами. Кроме того, в рамках диссертационной работы функциональная активность Grx1-roCherry была подтверждена в тканях модельного объекта *D.regio*.

Очень интересными и практически значимыми представляются полученные с помощью разработанного сенсора данные о независимом изменении редокс-статуса цитоплазматического и митохондриального пулов глутатиона в условиях, провоцирующих окислительный стресс, а также показанные различия в окислении глутатиона у раковых и нераковых клеток в ответ на переключение метаболизма с гликолиза на окислительное фосфорилирование.

Примененные автором самые современные молекулярно-биологические и цитологические методы полностью адекватны поставленным задачам. Работа выполнена на большом объеме экспериментального материала с использованием таких передовых подходов как флуоресцентная мультипараметрическая микроскопия, проточная цитометрия, геномная инженерия на различных модельных организмах, а также физико-химические методы анализа.

Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Все это позволяет сделать заключение о высокой репрезентативности результатов и выводов диссертации. Представленные в автореферате и публикациях Шохиной А.Г. результаты полностью отражают проведенные исследования.

При знакомстве с представленным экспериментальным материалом возникают небольшие замечания, требующие дополнительных комментариев и разъяснений диссертанта:

1. Поскольку вещество DMF может оказывать разнонаправленные эффекты на соотношение окисленной и восстановленной формы глутатиона, насколько можно быть уверенным, что соотношение будет меняться именно так, как постулирует в работе диссертант. В частности, не различаются ли абсолютные значения (а не нормализованный сигнал) у клеток, обработанных DMF и ДМСО.
2. Каким образом осуществлялась таргетная доставка в митохондрии (и наоборот цитоплазму) сенсоров Grx1-roCherry и Grx1-roGFP2 или фермента DAO. А также известно ли, насколько хорошо в митохондрии проникает субстрат DAO, D-норвалин.
3. Оценивалось ли в экспериментах на *Danio rerio* насколько глубоко в ткани проникает экзогенная перекись и можно ли детектировать флуоресценцию сенсора в глуболежащих слоях клеток.
4. Термин гипоксия в отношении использованной концентрации кислорода (0%) не вполне корректный, при такой концентрации правильнее говорить об аноксии.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают высокой научной ценности представленной диссертации.

Диссертационная работа Шохиной А.Г. представляет собой завершенное научное исследование. Результаты этой работы были опубликованы в высокорейтинговых журналах и докладывались на международных конференциях. Нет сомнений, что они найдут практическое применение в профильных учреждениях в России и за рубежом.

Диссертационная работа Шохиной Арины Геннадиевны полностью соответствует критериям, 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), а сама диссертантка несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология – 03.01.03.

**Заведующий лабораторией  
структуры и функции митохондрий  
НИИ физико-химической биологии  
им. А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова,  
д.б.н. Плотников Егор Юрьевич**



119992 Москва, ГСП-1,  
Ленинские горы, д.1, стр.73  
Тел.: 8-916-554-23-39  
E-mail: plotnikov@belozersky.msu.ru

Подпись д.б.н. Плотникова Е.Ю.  
«Удостоверяю»  
Ученый секретарь НИИ ФХБ МГУ  
д.ф.-м.н. Фетисова З.Г.

«10» февраля 2020г.

МП

