

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина
ФМБА России,
Д.С.Н., член-корреспондент РАН



М.А. Лагарькова

2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
на диссертационную работу Билана Дмитрия Сергеевича
«РЕДОКС-БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ IN
VIVO ИССЛЕДОВАНИЙ»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Актуальность темы диссертационной работы

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, заключалась в ограничениях инструментальной базы. В ходе окислительно-восстановительных процессов в клетках постоянно образуются низкомолекулярные окислители, взаимодействующие с большим разнообразием мишеней, отличающихся по своей природе. Время жизни таких окислителей во внутриклеточной среде составляет секунды, а в ряде случаев даже меньше. С момента своей генерации они практически сразу вступают в реакции со своим окружением. Основной подход к регистрации таких окислительно-восстановительных событий в живых системах основывался на определении ключевых маркеров окисления, в роли которых выступают определенные модификации макромолекул. Так, например, увеличение концентрации хлораминов свидетельствует о наличии галогенирующего стресса; нитрозилирование сульфгидрильных групп свидетельствует об активности синтаз оксида азота; наличие малонового диальдегида является маркером перекисного окисления липидов и т.д. Окислительно-восстановительный статус пулов глутатиона и/или НАД(Ф) также позволяет судить об общем окислительно-восстановительном гомеостазе клетки в целом. Однако такие подходы позволяют определять биохимические события косвенно, поскольку пространственно-временная динамика конкретного окислителя остается скрытой от исследователей. Более того, некоторые маркеры окисления вовсе не позволяют выявить точно участников реакции, например, дисульфидная связь в белке может быть результатом реакций этого белка с совершенно разными окислителями. Вопрос, касающийся определения динамики конкретных участников окислительно-восстановительных процессов, получил еще большую актуальность в свете того, что низкомолекулярные

высокореактивные соединения научным сообществом стали рассматриваться не только в качестве побочных продуктов реакций. К настоящему времени выявлено несколько ферментативных систем, которые осуществляют направленное и, что важно, контролируемое образование таких окислителей. Согласно представлениям современной биологии, внутриклеточные эффекты активных форм кислорода, азота, серы могут быть разными в зависимости от их концентрации в системе. Хорошим примером служат активные формы кислорода, которым изначально в клетках приписывали роль исключительно неспецифичных окислителей, определяющих негативные биологические процессы, прежде всего, старение и патогенез разных заболеваний. Однако сегодня доказано участие активных форм кислорода, а также азота и серы, в регуляции многих сигнальных каскадов, поддерживающих функционирование клеток в норме.

Интерес к выяснению биологических функций конкретных соединений с высокой реакционной способностью стимулировал разработку подходов к их регистрации. Получена обширная коллекция синтетических красителей, меняющих оптические свойства (чаще флуоресцентный сигнал) при окислительно-восстановительном переходе. Среди сотен подобных красителей многие действительно уже демонстрируют высокую чувствительность и селективны по отношению к конкретным окислителям, обладают необходимыми кинетическими характеристиками. Главный недостаток таких проб заключается в трудности их локализации в живых системах на уровне отдельных внутриклеточных компартментов. Кроме того, применение такого подхода в сложных моделях *in vivo* невозможно вовсе, это существенно затрудняет изучение сложных физиологических и патологических процессов с участием разных типов клеток и тканей на моделях животных *in vivo*.

Создание генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров стало прорывной технологией в изучении окислительно-восстановительных процессов в сложных биологических системах. Принцип использования белкового домена, выполняющего в клетке сенсорную функцию благодаря взаимодействию с определенным окислительно-восстановительным параметром, а также визуализация такой реакции с помощью флуоресцентного белка, лежит в основе создания многих современных генетически кодируемых сенсоров. Настоящая коллекция подобных молекулярных инструментов насчитывает несколько десятков, часть из них была создана при участии Билана Дмитрия Сергеевича – автора представленной диссертационной работы. Ген таких сенсоров может быть доставлен практически в любые биологические системы, в результате регистрация флуоресцентного сигнала позволяет оценивать динамику интересующего параметра в живом объекте в режиме реального времени. Разработка и применение таких сенсоров представляет стремительно развивающееся направление в современной биологии и медицине. Однако до сих пор многие особенности окислительно-восстановительной регуляции внутриклеточных процессов остаются малоизученными, поскольку не созданы подходящие сенсоры или не решены технические вопросы, позволяющие их применять *in vivo*. Так, например, обстоит дело с гипогалогенными кислотами и их производными – наименее изученным в биологическом контексте классом соединений с крайне высокой окисляющей способностью.

Диссертационная работа Билана Д.С. посвящена решению описываемых вопросов. Вклад автора в данную область биологии заключается как в разработке принципиально

новых типов сенсоров, так и развитии подходов их применения в различных моделях физиологических и патологических процессов *in vivo* с участием популярных лабораторных животных (грызуны, рыба *D. rerio*). Таким образом, актуальность диссертационной работы Билана Дмитрия Сергеевича не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов

В своей работе Билан Дмитрий Сергеевич представил новые типы генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. В частности, впервые были получены сенсоры для регистрации окислительно-восстановительного статуса глутатиона с эмиссией флуоресценции, лежащей в красном диапазоне спектра. Разработанный биосенсор Grx1-roCherry был применен в комбинации с другими спектрально различающимися сенсорами, что позволяет регистрировать одновременно несколько параметров в одних и тех же клетках. Эффективность представленного мультипараметрического подхода была наглядно продемонстрирована на различных типах клеток, в том числе при воздействии некоторых препаратов, влияющих на внутриклеточный окислительно-восстановительный баланс и метаболические пути. Впервые с помощью генетически кодируемых инструментов (оксидазы D-аминокислот, разработанного автором биосенсора Grx1-roCherry и ранее полученного другими исследователями Grx1-roGFP2) в разных типах клеток были исследованы особенности межкомpartmentных окислительно-восстановительных взаимодействий (рассмотрены ядро, цитозоль, матрикс митохондрий). В работе Билана Д.С. также представлен сенсор Nurocrates для регистрации динамики продуктов галогенирующего стресса, подобный инструмент на имеет аналогов в мире. Впервые с помощью данного сенсора была визуализирована динамика продуктов катализируемого миелопероксидазой окисления в фагосоме человеческих нейтрофилов, а также в тканях *D. rerio* в области воспаления, вызванного механическим повреждением. Существенная часть диссертационной работы Билана Д.С. посвящена исследованию окислительно-восстановительных событий в клетках в условиях гипоксии, исследования были проведены как на различных типах клеток в культурах (нейроны, кардиомиоциты), так и в моделях *in vivo* на крысах и рыбах *D. rerio*. В частности, с помощью высокочувствительного биосенсора нового поколения HyPer7 и технологии оптоволоконного нейроинтерфейса впервые была представлена динамика пероксида водорода в тканях мозга крысы при развитии ишемического повреждения. На объекте *D. rerio* в тканях, испытывающих недостаток кислорода, было продемонстрировано, что именно митохондрии являются источником образования пероксида водорода в острой фазе. Роли активных форм кислорода в патогенезе ишемических состояний посвящено большое количество работ, однако визуализация напрямую одного из главных представителей данного класса соединений была осуществлена впервые в работах Билана Д.С.

Научная и практическая значимость

Научная значимость результатов диссертационной работы Билана Д.С. связана с проведением комплексного исследования окислительно-восстановительных процессов с применением генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров, разработанных лично автором или при его участии. В работе были использованы различные объекты исследования, включая линейные и первичные культуры клеток, а также модели *in vivo* с

использованием лабораторных грызунов и рыб *D. rerio*. В работе наглядно продемонстрирована эффективность подхода комбинации различных сенсоров в одной системе исследования, что позволяет оценивать динамику одновременно нескольких параметров или одного и того же параметра, но в разных внутриклеточных компартментах. Такой подход отличает высокая информативность, что является преимуществом при оценке изучаемых эффектов на клетки. Например, в представленной работе было показано, что в клетках линии HeLa Kyoto тиоредоксин-зависимая система предотвращает распространение окислительных процессов из митохондрий в цитозоль, данный эффект снимается ингибированием тиоредоксинредуктазы. С помощью разработанного автором биосенсора Hurocrates впервые появилась возможность визуализировать в живых системах динамику галогенирующего стресса. В тканях рыбы *D. rerio* в условиях развивающегося воспаления была сопоставлена *in vivo* динамика пероксида водорода и активных форм галогенов. Биохимическая роль гипогалогенных кислот исследована гораздо меньше по сравнению с другими высокореактивными соединениями. Поэтому молекула сенсора Hurocrates в настоящий момент представляет собой наиболее изученный пример взаимодействия белковой молекулы с продуктами галогенирующего стресса. Так, например, белок Hurocrates демонстрирует высокую чувствительность к хлораминам. Полученные автором данные показывают, что даже такие агрессивные с химической точки зрения соединения, как гипогалогенные кислоты и их производные, могут оказывать разный эффект на белковые мишени. Для белка Hurocrates была также расшифрована пространственная структура, что имеет ценность в контексте понимания механизма функционирования не только созданного нового сенсора, но и других инструментов данного типа. Hurocrates является первым сенсором на основе флуоресцентного белка сrYFP, претерпевающим окислительно-восстановительные преобразования, для которого получены подробные данные о структуре. Особого внимания заслуживает раздел диссертации Билана Д.С., посвященный исследованию внутриклеточных параметров биологических систем в условиях гипоксии. Автор использовал разные модели как на клеточных культурах, так и *in vivo*, с применением уникальных технических решений. Их сочетание позволило детализировать некоторые особенности окислительно-восстановительных событий при гипоксии и ишемии.

Практическая значимость результатов Билана Д.С. определяется созданием новых молекулярных инструментов для исследования окислительно-восстановительных процессов. Все представленные инструменты детально охарактеризованы, а их потенциал применения наглядно продемонстрирован на различных моделях. Созданные Биланом Д.С. 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 разработку новых подходов к их терапии.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Положения, сформулированные в диссертации, основаны на большом объеме фактического материала, полученного с помощью современных экспериментальных биофизических методов. Выбор моделей и методов исследования и статистическая обработка полученных данных адекватны поставленной цели и задачам. Выводы работы

полностью базируются на совокупности приведенных данных. Так что научные положения, выводы и заключения диссертационной работы Д.С. Билана можно считать достоверными.

Полнота освещения положений и результатов диссертации в публикациях

По теме диссертации Биланом Д.С. опубликовано 42 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus, среди них такие высокорейтинговые журналы как Nature Communications, Cell Metabolism, Redox Biology, Free Radical Biology & Medicine и ряд других. Результаты работы также представлены в виде докладов на многочисленных мероприятиях международного и всероссийского уровней. Основные положения, выносимы на защиту, в полной мере отражены в опубликованных работах Билана Д.С. Технологии, разработанные автором, уже активно применяются другими лабораториями не только в нашей стране, но и высоко оценены зарубежом. Таким образом, результаты прошли надежную апробацию и хорошо известны исследователям в области изучения окислительно-восстановительных процессов.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа представлена в классическом варианте, изложена на 352 страницах текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список литературы и благодарности. Диссертация проиллюстрирована 85 рисунками и содержит 5 таблиц.

Во введении автор раскрывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, положения, выносимые на защиту, описывает новизну, теоретическую и практическую значимость работы, дает представление об объектах, методах и структуре исследования, обосновывает достоверность результатов.

В разделе «Обзор литературы» дается исчерпывающая литературная справка про современное состояние исследований в области биосенсоров на основе флюоресцентных белков.

В разделе «Материалы и методы» автор подробно описывает общие манипуляции с генетическими конструкциями, использованные клеточные модели и модели патологических процессов на животных, а также весь процесс создания новых флюоресцентных редокс-сенсоров от получения молекулярно-генетических конструкций до верификации их действия и локализации на клеточных культурах.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает результаты исследований, касающиеся создания новых редокс-биосенсоров: редокс-чувствительных белков с красной эмиссией флюоресценции и биосенсора для регистрации гипогалогенных кислот, раскрывает особенности редокс-процессов в моделях *in vivo* с помощью генетически кодируемых биосенсоров. Отдельно представлена разработка систем для исследования динамики биохимических параметров в условиях гипоксии/ишемии. Прослежены динамика ацидоза в культуре нейронов при гипоксии и в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте, динамика H_2O_2 в культуре нейронов при гипоксии и в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте. Впервые показано, что гипергликемия усугубляет последствия инсульта не через генерацию H_2O_2 , прослежены изменения редокс-

параметров в кардиомиоцитах при гипоксии/реоксигенации и проведена *in vivo* регистрация динамики гипогалогенных кислот и H_2O_2 при воспалении в тканях на модели рыбы *Danio*. Все исследования проведены тщательно, с использованием адекватных методик и способов анализа и статистической обработки данных.

В разделах «Заключение» и «Выводы» обобщены полученные экспериментальные данные, обоснованы основные положения работы и сформулированы выводы, которые в полной мере соответствуют поставленным задачам. В заключении четко обозначены перспективы практического применения результатов, подчеркнуты новые и оригинальные идеи работы.

Содержание диссертации дает основание для представления данной работы по специальности 1.5.3 Молекулярная биология, а представленная информация убедительно свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Работа написана хорошим научным языком, логично выстроена, выполнена на высоком современном уровне и оставляет исключительно положительное впечатление.

В качестве **достоинств** данной диссертационной работы необходимо отметить оригинальность разработанных автором редокс-биосенсоров на основе флюоресцентных белков, методик и инструментов моделирования и оценки гипоксии в клеточных культурах, особую оптоволоконную систему для мониторинга процессов ацидоза и формирования АФК прижизненно в мозге крыс на основе флюоресцентных биосенсоров и волоконной оптической системы, их широкую апробацию на моделях различной сложности и применимость к практическим задачам в области прижизненной визуализации редокс-процессов. 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.

Считаем, что результаты диссертационной работы Билана Д.С. важны для научных и прикладных исследований, поскольку способствуют лучшему пониманию особенностей редокс-процессов в живых системах и вносят весомый вклад в развитие флуоресцентных сенсоров.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Принципиальных замечаний к рецензируемой диссертационной работе нет. По сути работы имеются уточняющие **вопросы и комментарии**:

Автор впервые изучает в динамике развитие ацидоза и повышение концентрации H_2O_2 в модели ишемического инсульта мозга крыс, показывает особенности развития ацидоза в динамике и окислительного стресса (перекисного окисления). Далее идет сравнение развития указанных изменений у здоровых крыс и у крыс с моделированным «сахарным диабетом».

Безусловно, эксперимент и созданная оптоволоконная установка *in vivo* регистрации сигналов биосенсоров - революционные, но есть несколько уточняющих вопросов:

- автор пишет, что за неделю, путем введения стрептозоцина был смоделирован диабет у крыс, установлено достоверное повышение глюкозы в крови. По канонам моделирования диабета, говорить об устойчивом формировании патологии с развитием осложнений (сосудистых) можно только через 3 недели. Что по мнению автора явилось

определяющим в особенностях инсульта у крыс с патологией – гипергликемия или сосудистые осложнения СД?

- автор выявил большие зоны повреждения и изменения сигналов рН и H_2O_2 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 в периоды назначения терапии.

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

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

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

Несущественный комментарий. Пункт 3.2.5 «Биосенсоры на основе $srYFP$ в мультифотонном режиме возбуждения флюоресценции» органичнее смотрелся бы в разделах описания установок для визуализации, так как описывает принципиальную (очень важную) возможность наблюдать флюоресцентные сенсоры в многофотонном режиме и тем самым увеличивать глубину визуализации структур мозга.

Работа написана очень хорошим, доступным языком, но есть небольшое количество опечаток и некорректных терминов:

- употребляются Redox в английском варианте написания и редокс в русской транскрипции; поскольку русский термин существует, то можно оставить только его.

- на стр 176 использовано слово «анальгезия» – правильная анестезия (для местного обезболивания).

Поставленные вопросы и замечания носят дискуссионный характер и не могут умалить ценность полученных автором новых, достоверных и имеющих большую практическую значимость результатов.

Заключение

Таким образом, диссертация Билана Дмитрия Сергеевича на тему «РЕДОКС-БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЙ», представляет собой оригинальный, самостоятельный и законченный научный труд, изложенный в традиционной форме полнотекстовой диссертации, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок содержится решение научной проблемы по изучению редокс-процессов в клетках и тканях, имеющей важное научно-практическое значение для биологии и биомедицины. По своей актуальности,

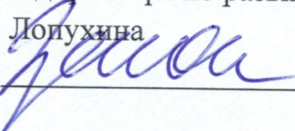
теоретической и практической значимости полученных результатов, их научной новизне, достоверности и обоснованности положений и выводов, диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в актуальной редакции), предъявляемым к докторским диссертациям, 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 им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол №6 от 25.09.2024 г.)

Доктор химических наук (03.01.03 – молекулярная биология), заведующий отделом клеточной биологии

Варижук Анна Михайловна 

Доктор медицинских наук (14.01.13 – лучевая диагностика), член-корреспондент РАН, заместитель генерального директора по развитию

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина
Загайнова Елена Вадимовна 

« 04 » 10 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Почтовый адрес: 119435, г. Москва ул. Малая Пироговская дом 1а, ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

E-mail: niifhm@fmbamail.ru

Телефон: +7 (499) 246-44 09

Подписи Загайновой Е.В. и Варижук А.М. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России,

кандидат биологических наук

Кострюкова Елена Сергеевна 

