

ФМБА РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение
«Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины Федерального
медико-биологического агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д.1А
Тел. (499) 246-77-21 Факс (499) 246-44-09
<http://www.niifhm.ru>, e-mail: info@niifhm.ru

05.02.2020 № 165

На исх № 209-217.1-44 от 21.01.2020

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины
Федерального медико-
биологического агентства»
академик РАН, д.б.н., проф.
Говорун В.М.



«5» февраля 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию 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.

Диссертационная работа Шохиной А.Г. посвящена созданию и применению нового генетически кодируемого инструмента, позволяющего во флуоресцентном канале регистрировать изменения окислительно-восстановительного статуса глутатиона в живых системах. Эти изменения сопутствуют большому количеству физиологических и патологических процессов, из-за чего разработка систем их прижизненного мониторинга представляет собой важную задачу современной молекулярной биологии, фармакологии и медицины.

Довольно долгое время инструментом выбора для детекции окисленной и восстановленной форм глутатиона являлись разнообразные синтетические красители. К очевидным недостаткам такого подхода можно отнести их специфическое взаимодействие только с какой-либо одной формой глутатиона и необратимость ответа. Перспективной альтернативой стали флуоресцентные белки, чувствительные к изменению окислительно-восстановительного статуса микроокружения. Разработанный на основе подобного зеленого флуоресцентного белка генетически кодируемый индикатор Grx1-roGFP2 позволил наблюдать за изменением соотношения 2GSH/GSSG в режиме реального времени в разных компартаментах в пределах одной клетки, а также на уровне тканей и модельных организмов. Дальнейшее

развитие этой отрасли требует создания аналогичного инструмента, отличного по спектральным характеристикам. Подавляющее большинство генетически кодируемых индикаторов, специфичных к разным ионам и молекулам, флуоресцируют в зеленом канале, что затрудняет или делает невозможным их совместное использование в пределах одной системы.

В рамках диссертационной работы автором был создан генетически кодируемый биосенсор соотношения 2GSH/GSSG под названием Grx1-roCherry, сигнал которого находится в красном канале флуоресценции. Протестировав его в системе *in vitro*, автор заключает, что по биохимическим характеристикам полученный индикатор сравним с популярным зеленым аналогом Grx1-roGFP2. Автор успешно применил разработанный инструмент на разных клетках в разных моделях, в том числе в условиях мультипараметрической микроскопии, когда несколько разных индикаторов были локализованы одновременно в разных внутриклеточных компартментах. Наконец, на примере *D. rerio* было успешно продемонстрировано, что Grx1-roCherry пригоден для детекции прижизненных изменений 2GSH/GSSG в толстых образцах.

Полученные автором результаты, несомненно, найдут свое применение как в фундаментальной науке, так и в прикладных областях для поиска и тестирования лекарственных препаратов, влияющих на окислительно-восстановительный статус клетки.

Диссертация составлена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, который включает 351 ссылку. Диссертация изложена на 120 страницах, содержит 30 рисунков и 4 таблицы. Оформление работы не вызывает нареканий. Текст диссертации написан грамотным языком, последовательно, не составляет труда проследить логику повествования. Результаты каждого раздела дополнены рассуждениями и аргументированными выводами. С точки зрения обозначенной научной проблематики работа носит завершённый характер. Исследование проведено на высоком методическом уровне, с использованием современных молекулярно-биологических, биохимических и микроскопических подходов. Достоверность приведенных в работе данных подтверждена статистически. По результатам работы были опубликованы статьи в высокорейтинговых журналах (6), а также проведены выступления на российских и международных конференциях (2).

Обзор литературы в полной мере отражает современные представления о роли глутатиона в живых системах, а также о способах его детекции и визуализации. Все решенные в ходе выполнения работы задачи отвечают ее цели – созданию и последующем применении генетически кодируемого индикатора для регистрации динамики изменения соотношения 2GSH/GSSG на основе красного флуоресцентного белка. Раздел о методах, которые были применены в исследовании, в полной мере охватывает спектр использованных подходов, все

они могут быть воспроизведены на основе приведенного описания. Результаты исследования полностью соответствуют поставленным задачам и полученным выводам. Изложение результатов в диссертации соответствует их изложению в автореферате. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений. Содержание автореферата отражает основные идеи и выводы диссертации.

Принципиальных замечаний по работе не имеется. Есть несколько моментов, на которые хотелось бы обратить внимание диссертанта.

В работе встречаются стилистические погрешности, а также пунктуационные ошибки.

Обзор литературы дает полное представление о месте глутатиона в современной редокс-биологии, стилистически хорошо написан, однако, занимает практически половину объема диссертационной работы.

В разделе 3.2.1 «Получение препарата очищенного белка» приведена методика выделения целевого белка из колоний, выросших на твердом агаре. Нигде в тексте не дается пояснений, почему для этого не используется жидкая культура.

Автор работы использует целый ряд химических соединений для тестирования работы биосенсора: перекись водорода, дихлороацетат и другие. Однако, остается неясным, проводилось ли определение цитотоксичности этих соединений в выбранных концентрациях по отношению к клеточным линиям.

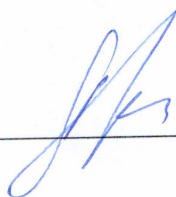
Отмеченные выше замечания не снижают общего впечатления о работе как о квалифицированном научном труде высокого уровня.

Результаты исследования могут быть использованы в различных институтах РАН и РАМН, научно-исследовательских и научно-клинических центрах (Курчатовский институт, Институт физико-химической медицины, Центр цереброваскулярной патологии и инсульта, Институт биохимии им. А.Н.Баха, Институт биологии гена, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, Институт молекулярной генетики, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта, Институт канцерогенеза, Институт общей генетики им. Н.А.Вавилова, Институт цитологии), на биологическом и химическом факультетах МГУ им. М.В.Ломоносова и СПбГУ, а также в других профильных учреждениях в России и за рубежом.

Высказанные замечания не умаляют значимости полученных в процессе выполнения диссертации результатов. Диссертационная работа Шохиной Арины Геннадиевны 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.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре отдела клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», протокол № 4, от 05 февраля 2020 года.

Составитель отзыва Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, доцент, заведующий отделом клеточной биологии, заведующий лабораторией геномной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.


_____ (В.Н.Лазарев)

Адрес: Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а, +7 (499) 255-2846
E-mail: lazarev@grcm.org

Подпись Лазарева В.Н. заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России
К.б.н.



(Е.С. Кострюкова)