

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
26 февраля 2020 года

Защита диссертации
на соискание учёной степени кандидата биологических наук
Шохиной Арины Геннадиевны
**Генетически кодируемый индикатор для регистрации редокс-статуса пула
глутатиона на основе красного флуоресцентного белка mCHERRY**
специальность: 03.01.03 — молекулярная биология

Москва — 2020

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 26 февраля 2020 года.

Председатель диссертационного совета д.х.н., академик РАН **Иванов В.Т.**

Учёный секретарь диссертационного совета д.физ.-мат.н. **Олейников В.А.**

Из 30 членов совета присутствует 20 человека, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
3.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
4.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
8.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
10.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
11.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
12.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
13.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
14.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
16.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
17.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
18.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
19.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Иванов Вадим Тихонович: Коллеги, доброе утро! Есть предложение – начать нашу работу. Мне говорят, что можно принимать решение. Нет возражений. Приступаем к работе. Итак, первая защита. Шохина Арина Геннадиевна. Материалы личного дела, пожалуйста.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что материалы личного дела и документы предварительной экспертизы соответствуют требованиям Положения ВАК)

Да, вот здесь у меня в руках материалы личного дела. Шохина Арина Геннадиевна, гражданка Российской Федерации. В 2014-м году окончила биофак МГУ. С 14-го по 15-й инженер-исследователь в нашем институте. С 15-го по настоящее время младший научный сотрудник нашего института. Это отдел метаболизма и редокс-биологии. С 14-го по 18-й обучалась в аспирантуре нашего института – института биоорганической химии. Кандидатские экзамены, в том числе, по специальности «Молекулярная биология», сданы с оценкой «отлично». Работа вся выполнена в группе метаболических основ патологии отдела метаболизма и редокс-биологии нашего института. Научный руководитель – Билан Дмитрий Сергеевич, руководитель группы метаболических основ патологии. По теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 23 декабря 19-го года. И все необходимые документы в деле есть.

Иванов Вадим Тихонович: Есть ли какие-то уточнения или вопросы, неясности? Как правило, не бывает. Сегодня исключения нет из этого правила. Арина Геннадиевна, Вам слово для доклада. 20 минут.

Шохина Арина Геннадиевна:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам. Переходим к обсуждению. У кого есть вопросы? Или всё было очень чётко доложено? Или скорость была такова, что люди просто не успевали понять? Да, прошу.

Безуглов Владимир Виленович: У меня вопрос, связанный с чувствительностью Вашего сенсора к другим активным молекулам, в частности, к NO. Вы это показали в искусственной системе?

Шохина Арина Геннадиевна: Да!

Безуглов Владимир Виленович: Но когда Вы стимулировали окислительный стресс в своих клетках, проверяли ли Вы, образуется ли там NO хотя бы? И в каких количествах? И не может это повлиять на результаты Ваших экспериментов? И в качестве комментария я хотел отметить, что диметилфумарат взаимодействует не с Nrf2, а с его ингибитором KEAP1. Он его после соединения позволяет ему диссоциировать от Nrf2, и Nrf2 тогда попадает в ядро и запускает эти процессы.

Шохина Арина Геннадиевна: Да. Спасибо за замечание. Да, совершенно верно, диметилфумарат действительно не напрямую взаимодействует с Nrf2, а опосредованно. Это было некоторое обобщение. Спасибо. Что касается чувствительности индикатора. Как я уже говорила, чувствительность индикатора, в том числе, к NO, имеет место в тех случаях, когда концентрация NO очень велика. В физиологических диапазонах значений NO этот индикатор не проявляет какой-либо выраженной чувствительности к этому окислителю. И так как он является чрезвычайно чувствительным к глутатиону, можно

сказать, что тот сигнал, который мы видим в наших живых системах, в основном обусловлен изменениями в редокс-статусе именно глутатиона.

Безуглов Владимир Виленович: Вы не проверяли?

Шохина Арина Геннадиевна: Нет, этого мы не проверяли в системах *in vivo*, это было проверено только в условиях системы *in vitro*.

Безуглов Владимир Виленович: В общем, в искусственных, не на клетках?

Шохина Арина Геннадиевна: Да.

Безуглов Владимир Виленович: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Ещё были вопросы? Да, прошу.

Долгих Дмитрий Александрович: Скажите, пожалуйста, вот в разработанной Вами системе разработан индикатор. Как Вы считаете, есть ли какие-то задачи, где он настолько эффективнее, чем другие многочисленные, что может использоваться преимущественно или что-то заменить? Или это просто дополнение к существующему набору индикаторов? Успешное дополнение, но всё-таки так, чтобы он что-то вытеснил и стал преимущественным, вот такого нет?

Шохина Арина Геннадиевна: Я думаю, что речь о вытеснении какого-либо из существующих индикаторов не идёт. Здесь преследовалась несколько другая задача. Если бы перед нами стояла задача – получить наиболее эффективный из когда-либо существовавших редокс-индикаторов, мы занялись бы улучшением зелёного аналога Grx1-roGFP2. Наша задача была сформулирована иным образом. Мы в первую очередь ставили перед собой целью расширить перспективы мультипараметрического имаджинга, потому что уже накоплено достаточно знаний о том, что редокс-события в пределах разных компартментов обладают разным характером, регулируются разными системами. И именно это представляет собой особый интерес при изучении каких-либо редокс-изменений. Поэтому наличие красного индикатора нам позволяет именно комбинировать его в пределах одной системы с некоторыми другими и таким образом расширять накопленные знания.

Иванов Вадим Тихонович: Сергей Кириакович.

Завриев Сергей Кириакович: У меня такой чисто технический маленький вопрос. У Вас на нескольких графиках по оси ординат написано «плотность сигнала». Что подразумевается под понятием «плотность сигнала»? Я, честно говоря, так первый...

Шохина Арина Геннадиевна: Это некоторая математическая функция, которая была применена нами при обработке данных. Изначально – это количество событий. То есть количество клеток, которые мы детектируем с определённым значением интенсивности флуоресценции. В ходе математической обработки мы применили некоторую функцию, которая называется кернеловская ядерная плотность, которая позволила нам сгладить вид этих пиков. То есть из таких достаточно ребристых графиков мы получили чуть более сглаженные.

Завриев Сергей Кириакович: Понятие плотность сигнала – это Вы придумали?

Шохина Арина Геннадиевна: Нет, это общепринято.

Завриев Сергей Кириакович: Что-то я никогда не встречал. Ладно, спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Другой вопрос. Да, прошу.

Овчинникова Татьяна Владимировна: У меня вопрос по поводу шестого вывода, который звучит так: «Функциональная активность биосенсора была успешно протестирована в тканях модельного объекта *Danio rerio*».

Всё-таки выводы кандидатской диссертации – это обычно какое-то новое знание, которое получено в результате Вашей работы. Что значит – успешно протестированы или неуспешно протестированы? Можете переформулировать как-то этот вывод, чтобы мы понимали, в чём успешность?

Шохина Арина Геннадиевна: Да, спасибо. Дело в том, что создание именно красного флуоресцентного индикатора в первую очередь помимо необходимости комбинации его с другими индикаторами, спектрально отличимыми, она обусловлена также необходимостью использования его в системах *in vivo*. Это одно из основных приложений. Потому что, как я уже говорила, в системах *in vivo* есть некоторые условия, так называемое оптическое окно, где детекция эмиссии флуоресценции является наиболее удобной просто по техническим причинам. Поэтому создание красного флуоресцентного индикатора в первую очередь важно для *in vivo* исследований. Поэтому этот вывод вынесен отдельно, потому что представляет собой некоторую особенную значимость для нас как для людей, которые хотели привнести что-то для *in vivo* исследований.

Иванов Вадим Тихонович: Вопросы иссякли? Спасибо. Дальше у нас по процедуре научный руководитель, если желает, может охарактеризовать диссертанта. Желание есть? Есть. Слушаем внимательно.

Билан Дмитрий Сергеевич: Здравствуйте, уважаемые коллеги! Для меня огромная честь и гордость – присутствовать здесь сегодня, потому что это первая защита работы под моим руководством. С Ариной Геннадиевной мы познакомились, когда я был аспирантом в группе Всеволода Владимировича Белоусова, а Арина Геннадиевна, соответственно, была студенткой МГУ, которая выполняла дипломный проект. Таким образом, у нас крайне незначительная разница в возрасте. Это означает, что мы осваивали вместе какие-то навыки, мы вместе делали ошибки и вместе работали над тем, как эти ошибки устранить. Соответственно, наше сотрудничество привело к такому довольно масштабному проекту, о котором рассказывала Арина Геннадиевна.

Что касается Арины Геннадиевны, то я хотел бы выразить огромную признательность за её труд, поскольку в истории проекта возникали, я бы сказал, тупиковые ситуации. Дело в том, что изначально у нас получались версии плохого биосенсора, а мы создавали инструмент, создавали новый подход. Это означает, что никому не нужен плохой инструмент или плохой подход. И, в принципе, можно было бы бросить, сэкономить время и переключиться на какие-то новые проекты. В нашей области наук так и происходит, и мы так делали. Но Арина Геннадиевна несколько раз, точнее трижды, начинала проект просто заново. Она брала другой белок, и все этапы проходила заново. Таким образом появился инструмент, который уже занял определённую нишу в мировой коллекции биосенсоров. Арина Геннадиевна является душой этого проекта, руками этого проекта. Он держался на её энтузиазме, упорстве. И для меня её пример становится творением в жизни пословицы: «Терпение и труд всё перетрут». Это действительно про Арину. Сейчас Арина занимается многими другими проектами, которые не связаны с темой её диссертации. Она хороший специалист, и я уверен, что в будущем у неё много интересной и созидательной работы. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам. Дальше мы должны заслушать заключение организации, где работа выполнялась, где делали диссертацию. А также отзыв ведущей организации. Два отзыва.

Олейников Владимир Александрович: *(Зачитывает заключение организации).*

По положению ВАК мы должны заслушать ещё и заключение той организации, где выполнялось. Вот это заключение у меня в руках. И это заключение достаточно подробное. Во-первых, говорится о том, кто она, что она закончила. Это в преамбуле в начале защиты уже прозвучало. Далее тема диссертации утверждена была на заседании учёного совета ещё 3 декабря 14-го года. И вот она работает по сейчас, вот она представлена, эта диссертация. Выполнена на высоком теоретическом, методологическом и практическом уровне, в заключении говорится. Формулируется цель работы. Оценка достоверности показана. Далее здесь фактически представлены фрагменты того, что мы с вами слышали, поэтому я эту часть опускаю.

Личный вклад Шохиной заключается в планировании и проведении экспериментов, в обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций. Дизайн, сборка и первичное тестирование молекулярно-генетических конструкций выполнено лично соискателем. Эксперименты на линиях эукариотических клеток на первичной и смешанной культуре мышинных кортикальных нейронов и малых этих рыбок также проведены соискателем лично.

И в результате здесь говорится, что результаты работы представлены. И вот эта диссертация рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология». Принято на заключении отдела метаболизма и редокс-биологии нашего института. Результаты голосования: единогласно, все «за». Подписано Белоусовым, доктором биологических наук, профессором РАН, завотделом метаболизма и редокс-биологии и Ямпольским Ильёй Викторовичем, доктором химических наук, замдиректора ИБХ РАН. Утверждено директором нашего института академиком Александром Габитовичем Габитовым. Это вот по поводу заключения.

(Зачитывает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный).

Теперь у меня в руках отзыв ведущей организации. Ведущей организацией было Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФМБА). И отзыв полностью положительный. В преамбуле говорится, что диссертационная работа Шохиной посвящена созданию и применению 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. Это фактически по поводу актуальности.

Далее. В рамках диссертационной работы автором был создан генетически кодируемый биосенсор соотношения окислительно-восстановительного состояния глутатиона, он был протестирован. И автор успешно применил разработанный инструмент на разных клетках в разных моделях. В том числе, в условиях мультипараметрической микроскопии.

Диссертация составлена по традиционному плану. Введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты, выводы, заключение. Ссылки 351. Изложена на 120 страницах, содержит 30 рисунков и 4 таблицы.

Обзор литературы. Он в полной мере отражает современное представление о роли глутатиона в живых системах, а также о способах его детекции и визуализации. Кратко изложена суть работы и достоинства её.

По поводу замечаний. 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 даёт полное представление о месте глутатиона в современной редокс-биологии. Стилистически хорошо написан, однако занимает практически половину объёма диссертационной работы. В разделе 3.2.1 «Получение препарата очищенного белка» приведена методика выделения целевого белка из колоний, выросших на твёрдом агаре. Нигде в тексте не даётся 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 остаётся 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 квалификационном научном труде высокого уровня. Перечисляются различные организации, где могут быть использованы эти результаты. И замечания не умаляют значимости. И диссертационная работа Шохиной Арины Геннадиевны соответствует критериям, установленным Положением о присуждении учёных степеней. Конкретно указываются постановление правительства, номера и даты. И отзыв обсуждён и утверждён на семинаре отдела клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА» 5 февраля 20-го года. Составитель отзыва: Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, завотделом клеточной биологии, завлабораторией генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. И он подписан - Лазарев. Утверждён генеральным директором этого института академиком РАН доктором биологических наук профессором Говоруном Вадимом Марковичем.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Были замечания, на которые хорошо было бы ответить. Прошу, Арина Геннадиевна.

Шохина Арина Геннадиевна: Что касается замечаний о том, что обзор литературы в моей работе занимает больше половины её, это действительно так. Но коль скоро в этом замечании не упомянуто о том, что результаты расписаны недостаточно подробно и недостаточно качественно, думаю, что это замечание я могу пропустить?

Касательно экспрессии белка, его вида – у нас действительно методика выделения нашего белка была действительно несколько нестандартной. Это было обусловлено в первую очередь тем, что он обладает исключительной чувствительностью и очень быстро окисляется просто в присутствии кислорода. Поэтому мы пробовали разные технологии. И в итоге остановились на той, которая использована в моей диссертации, описана в моей диссертации. То есть способ обусловлен только этим.

Что касается определения цитотоксичности использованных веществ. Из тех двух веществ, что мы использовали, а именно диметилфумарат и DCA, оба достаточно давно используются в терапевтической практике. Это зарегистрированные медицинские препараты. Их цитотоксичность изучена на всевозможных клеточных линиях, на всех их типах, на всех их стадиях и так далее. Поэтому выбирая используемые концентрации, мы руководствовались в первую очередь теми данными, которые были описаны в литературе, и теми клеточными линиями, для которых это было сделано.

Что касается пероксида водорода. Как известно, в нашей лаборатории был получен первый индикатор, специфичный к пероксиду водорода, мы очень часто используем его в

своей работе. И поэтому некоторые знания о том, какие концентрации пригодны для использования в живых клетках, особенно, в частности, в клетках HeLa Kyoto, в нейронах у нас тоже есть. То есть можно с уверенностью утверждать, что мы использовали некоторые средние значения, не приводящие к смерти клеток.

Иванов Вадим Тихонович: Всё у Вас? Спасибо. Других отзывов на диссертацию или автореферат сейчас у нас не поступило. И поэтому можем переходить к заслушиванию отзывов официальных оппонентов. Егор Юрьевич Плотников, доктор биологических наук, Институт имени Белозерского, МГУ.

Плотников Егор Юрьевич: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*

Добрый день, уважаемые коллеги! Все мы понимаем, что редокс-биология сейчас является чрезвычайно востребованной областью знаний, потому что редокс-процессы являются не только основой биоэнергетики и всего метаболизма клетки, но и основой клеточного сигналинга. И сейчас всем занимающимся и этой областью, и смежными областями, понятно, что очень во многих патологиях, может быть, даже можно говорить, что практически во всех патологиях принимает участие такое явление как окислительный стресс, то есть избыточная продукция оксидантов и невозможность клетки их убрать. Но с другой стороны, сейчас всё более становится очевидным, что обратная ситуация, называемая редокс-стрессом, она тоже может являться чрезвычайно опасной для клетки, потому что клетке важно чувствовать сигнал. И, соответственно, как уничтожение самого сигнала, то есть если сигнал обусловлен именно активными формами кислорода, то уничтожение его ведёт к ровно таким же патологическим последствиям, как и избыточная генерация этих активных форм кислорода уже на патологическом уровне. Именно поэтому сейчас огромное количество исследователей занимается тем, что изучает окислительный стресс, в меньшей степени редокс-стресс. Но количество этих работ тоже сейчас растёт. И на данный момент, конечно, подавляющая масса работ реализуется с помощью систем, которые сейчас являются классическими, то есть химических сенсоров. Химических сенсоров активных форм кислорода, химических сенсоров перекиси липидов различных, глутатиона того же, супероксида и так дальше. И уже упоминавшиеся в докладе, и множество известных ограничений таких химических сенсоров, в частности, их неспецифичность, чувствительность к рН и так далее, они диктуют необходимость поиска новых сенсоров. Новых типов принципиально новых сенсоров. И вот одним из таких подходов является разработка сенсоров на основе генетически кодируемых конструкций, то есть белков, чувствительных к тому или иному субстрату. И именно разработке одного из таких сенсоров и была посвящена эта работа. Очевидно, что она весьма актуальна, потому что именно это направление сейчас начинает доминировать в редокс-биологии.

Надо отметить, что сенсор на глутатион уже существовал. Арина Геннадиевна об этом упоминала. Но и необходимость мультипараметрических исследований, и необходимость исследований *in vivo* на крупных объектах, она диктует важность разработки именно сенсора на основе именно красных белков. Потому что, во-первых, нам часто нужно измерять два каких-то сигнала. И если у нас есть какой-то сигнал, измеряемый зелёным белком или химическим соединением, соответственно, глутатион хотелось бы измерять красным. И с другой стороны необходимо большее проникновение флуоресценции возбуждающего света в ткани, а это возможно именно при использовании длинноволновых сенсоров. Вот именно поэтому был выбран этот объект, была выбрана, поставлена такая задача Ариной Геннадиевной. И, мне кажется, она была достаточно успешно в этой работе решена.

Что касается самой работы. Я кратко скажу, что диссертационная работа построена по классической схеме. Состоит из введения, обзора литературы, методов экспериментальной части, результатов, выводов, заключения. Иллюстрирована 30-ю рисунками. В принципе, текст написан достаточно хорошим языком научным, содержит, безусловно, некоторое количество опечаток и ошибок, но, мне кажется, они никак не снижают возможности нормально воспринимать этот текст.

В обзоре литературы, уже упоминалось, достаточно большим, Арина Геннадиевна полностью описывает, как современное представление о биологии глутатиона, так и о методах его детекции, имеющихся на данный момент. Также о молекулярно-биологических подходах в целом к решению вопроса детекции различных соединений. Методы тоже описаны достаточно подробно и хорошо, кроме нескольких замечаний, о которых я скажу позже. Самое главное, они в целом позволяют воспроизвести, что очень важно для науки. Воспроизвести все использованные подходы. И разнообразие их свидетельствует, безусловно, о высокой квалификации диссертанта.

Результаты. Они, безусловно, оригинальны. Я выделю среди уже упоминавшихся здесь несколько, которые мне показались особенно важными. В частности, это то, что был создан вот этот генетически кодируемый индикатор соотношения пула глутатиона. И описана полностью его характеристика. Зонд полностью охарактеризован, и исследователи в дальнейшем могут использовать эту информацию в своей работе.

Самое главное, что была оценена помимо *in vitro* его чувствительность к различным самым распространённым оксидантам. И самое главное, что было оценено уже и *in vivo* на модельных организмах многоклеточных, на клеточных системах была оценена и подтверждена его основная предполагавшаяся функция чувствительности к количеству восстановленного и окисленного глутатиона. Мне кажется, как человеку, занимающемуся много именно биологией митохондрий, очень важным и интересным сделанный уже непосредственно научный вывод с помощью разработанного сенсора о компартиментализации сигнала. Редокс-сигнала, сигнала от активных форм кислорода, разделяемым между митохондриями и цитоплазмой. И вот то, что Арина Геннадиевна показала достаточно интересные данные о том, что этот сигнал не только компартиментализован, но и по-разному реагирует на окислители в разных типах клеток, то есть опухолевых, неопухолевых, что является достаточно ключевым параметром для возможных таргетных воздействий на опухолевые клетки. В частности, при переключении вот их метаболизма с окислительного фосфорилирования на гликолиз или наоборот. Методы, применённые, как я уже говорил, молекулярно-биологические и клеточно-биологические, они полностью адекватные, наиболее современные, интересные. Большое количество экспериментального материала, статистически, безусловно, всё достоверно. Поэтому здесь никаких вопросов у меня не возникает. И также практически все результаты представлены как в автореферате, так и в публикациях диссертанта.

Но, тем не менее, несколько вопросов и замечаний у меня есть. Ключевое касается исследования диметилфумарата и моделей, которые были исследованы. Здесь уже по этому поводу некоторый вопрос прозвучал. У меня он немножечко отличный. Поскольку Арина Геннадиевна сама в своей диссертации упоминает, что диметилфумарат имеет разнонаправленные эффекты, они разделены во времени, но, тем не менее, он может подавлять, уменьшать количество восстановленного глутатиона, а может его увеличивать. Да, это как-то разделено во времени. Но, тем не менее, дальше выводы из экспериментов, которые сделаны с использованием диметилфумарата, они основываются на том, что

Арина Геннадиевна считает, что он увеличил пул восстановленного глутатиона. Тем не менее, насколько можно быть уверенным, что это именно так? Насколько можно быть уверенным, поскольку дальше именно на этом основывается интерпретация данных. А, скажем, на представленных рисунках, которые здесь и в докладе, и в автореферате представлены, там представлен нормализованный сигнал. На самом деле мы не можем точно знать, исходя из этого сигнала, был ли пул глутатиона увеличен, был ли он, наоборот, уменьшен. Потому что исходная точка перед действием перекиси, которая дальше, мы понимаем, безусловно, действует как окислитель, она равняется 100%. И, соответственно, мы здесь вот не можем точно сказать, на каком уровне глутатиона начала действовать эта перекись – на повышенном, на пониженном? А из этого исходя, могут быть разные интерпретации полученных данных.

Далее не очень чётко то, о чём я сказал в методической части, не очень чётко описано, каким образом осуществлялась таргетная доставка в митохондрии, цитоплазму, ядро и разработанного, и других сенсоров, в частности, на основе зелёного белка. Как осуществлялась таргетная доставка в митохондрии, например. Просто сказано, что он был направлен в митохондрии. С помощью чего? Хотелось бы этот вопрос прояснить.

И то же самое касается системы таргетной генерации перекиси с помощью DAO и её субстрата – тоже каким образом этот фермент доставлялся в митохондрии, например?

И, кроме того, вот использованный субстрат этого фермента тоже нужно каким-то образом конкретизировать. Как он, вообще говоря, проникает или не проникает? Существует ли транспортёры его в митохондрии, в ядро? Потому что от этого тоже будет зависеть интерпретация результата.

Ещё один вопрос у меня - чисто такой образовательный интерес уже как исследователя, который, возможно, когда-то будет использовать эти работы Арины Геннадиевны. Сенсор насколько в опытах на *Danio rerio*, насколько глубоко мы можем детектировать сигнал? Для этого нужно понять, насколько глубоко в этой модели проникает перекись, экзогенно добавленная? Можно на этой личинке рыбы предполагать, что перекись проникла достаточно глубоко, соответственно, достаточно глубоко мы можем детектировать сигнал? Поскольку здесь пользовались в основном, я так понимаю, всё-таки флуоресцентной микроскопией, а не конфокальной, то по Z оси сложно судить, насколько глубоко мы детектируем сигнал.

И ещё одно замечание чисто из серии «придраться». Поскольку упоминалась гипоксия, но при этом пишется, что концентрация кислорода была ноль процентов. Вообще говоря, если ноль процентов, то это не гипоксия, а аноксия. Как бы в терминологии в области редокс-биологии когда Вы работаете, нужно быть более аккуратной.

Но, тем не менее, я считаю, что эти замечания не носят принципиального какого-то критического характера. Не снижают высокой научной и практической ценности диссертации. Дальше я должен сказать вот это официальное специальное заключение, что диссертация представляет собой завершённое научное исследование. Результаты её опубликованы в высокорейтинговых журналах, докладывались на конференциях. Нет сомнений, что они найдут высокое практическое применение в профильных учреждениях и России, и за рубежом. Диссертационная работа Шохиной Арины Геннадиевны полностью соответствует критериям, установленным положением ВАК. И сама диссертантка, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология». Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам. Арина Геннадиевна, Ваша очередь.

Шохина Арина Геннадиевна: Что касается использования диметилфумарата и его разнонаправленного действия. Действие диметилфумарата действительно разнонаправлено, оно разнесено по времени. Как я уже сказала, в первые несколько минут – в первый час после проникновения в цитоплазму, диметилфумарат действительно вызывает кратковременный окислительный стресс, который, однако же, не носит какого-либо ярко выраженного характера, в более долгосрочной перспективе по достижению десятка часов – 24 часов диметилфумарат оказывает противоположное действие, приводя к накоплению восстановленного глутатиона. Эти данные, так как диметилфумарат достаточно часто подвергался различным изысканиям научным, и механизм его действия хорошо изучены. И то, что спустя 24 часа после инкубации с диметилфумаратом в цитоплазме клеток самых разных клеточных линий происходит накопление его восстановленной формы – это хорошо известный из литературных источников факт. Мы опирались на него, когда формировали свои выводы и заключения из этого эксперимента. Что касается разницы в абсолютных значениях. У нас на наших изображениях действительно приведены нормализованные данные. Если рассматривать абсолютные исходные значения, то, безусловно, они будут отличаться у тех клеток, которые диметилфумаратом были обработаны, и у тех клеток, которые им обработаны не были. И это нормально, так должно быть. Поскольку раз уж мы утверждаем, что использование диметилфумарата приводит к накоплению восстановленного глутатиона в цитоплазме, это автоматически означает, что соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона изменяется. Коль скоро наш индикатор отражает именно соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона, яркость его флуоресценции будет зависеть от этого соотношения. И это значит, что в исходной точке, когда окислитель ещё не был добавлен, интенсивность сигнала у клеток контрольных и опытных в этом эксперименте будет отличаться. И это говорит нам лишь о том, что индикатор работает и действительно отражает соотношение окисленного и восстановленного глутатиона. То есть он регистрирует именно изменение динамики пула глутатиона, а не какую-либо одну из его форм. Это в рамках эксперимента, мы об этом знали, и так и должно быть.

Что касается таргетной доставки. Все наши конструкции мы локализовали в пределах каких-либо компартментов, используя специальные сигналы локализации. Если речь идёт о матриксе митохондрий, мы использовали сигнал, который называется MTS, который молекулярно-биологическими методами мы присоединяли к 5'-концу гена, на уровне гена, к нашей конструкции. Причём, этот сигнал был дублирован. У всех конструкторов, которыми мы пользовались, этот сигнал присутствовал.

Что касается доставки в ядро, она осуществлялась по схожему принципу, за исключением того, что сигнал локализации (если мы говорим о митохондриях, то сигнал локализации - это фрагмент субъединицы цитохром-С оксидазы митохондриальной), если мы говорим о сигнале локализации в ядре, это вирусный Т-антиген SV40, который был на уровне гена присоединён к 3'-концу.

Что касается локализации в цитоплазме, никаких сигналов мы не использовали, просто конструктор без каких-либо сигналов локализуется в цитоплазме по умолчанию.

Касательно доставки D-норвалина в митохондрии. Каких-либо достоверных данных о том, как это происходит, какие транспортёры принимают в этом участие, сейчас в литературе не существует. Однако же мы можем судить о том, что он проникает в митохондрии по сигналу наших индикаторов. И здесь дополнительно я хотела бы сказать, что параллельно в нашей лаборатории проводились схожие эксперименты, за тем исключением, что

использовали индикатор не глутатиона, а индикаторы пероксида водорода. И с использованием этих индикаторов было показано, что именно пероксид водорода, генерируясь в митохондриях, мигрирует за их пределы. То есть воздействие диметилфумарата (*оговорка, им. в виду D-норвалин*) напрямую связано с этим событием. Следовательно, мы можем заключить из этого, что D-норвалин проникает в матрикс митохондрий.

Что касается проникновения пероксида водорода в ткани малька *Danio rerio*. Я уже говорила, и на графике эта информация была приведена, что концентрация пероксида водорода, которую мы использовали, 50 Ммоль – это очень высокая концентрация пероксида. Конечно же, в физиологических условиях она не достигается никогда. Она была выбрана нами, потому что, и как раз потому что пероксид очень плохо доставляется в ткани мальков. В частности, на клетках было показано с использованием первого, кажется, НуРег'а, что градиент пероксида при проникновении из внеклеточного пространства в цитоплазму составляет около 600. То есть в 600 меньше раз пероксида достигает, в конечном счёте, цитоплазмы. Поэтому из того объёма пероксида, который мы вносим в среду к животным, достигает клеток минимальное его количество. Однако же мы не оценивали глубину проникновения. Вы уже сказали, и это верно, что можно использовать конфокальную микроскопию с последующей 3D-реконструкцией, и посмотреть, с какой глубиной это происходит. Однако же мы не ставили перед собой такой задачи, потому что это, безусловно, был некий грубый эксперимент, целью которого было просто продемонстрировать, что индикатор функционирует в тканях. В дальнейшем, конечно же, нас будет интересовать генерация эндогенного пероксида в тканях, в том числе, животных, где флуоресцентный сигнал может быть детектирован повсеместно во всём объёме ткани, там, где это необходимо.

Что касается терминологии в экспериментах с гипоксией, там действительно фигурирует значение ноль. При этом мы оговариваем это как гипоксию. Это связано с некоторыми техническими моментами. Дело в том, что ноль процентов – это исключительно технический термин, который мы выставляли на установке, которая задавала состав газовой смеси. Однако же датчики, которые анализируют этот состав и дают нам какие-то сведения о нём, располагались за пределами клеточной среды, в которой производили микроскопию, и, конечно же, за пределами цитоплазмы. Поэтому можно однозначно судить, что в цитоплазме значение ноль процентов кислорода, конечно же, не достигалось. Иначе просто клетки бы у нас погибали значительно быстрее. Поэтому здесь есть такая двойственность. Да, это действительно так. Кажется, всё.

Плотников Егор Юрьевич: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Если Егор Юрьевич хочет ещё поdiscутировать, у нас будет ещё общая дискуссия, там можно будет продолжить это обсуждение. А сейчас мы слушаем Александра Павловича Савицкого, доктора химических наук, Институт биохимии имени Баха.

Савицкий Александр Павлович: (*излагает отзыв, отзыв положительный*)

Да, я, скорее, как химик буду рассказывать, потому что я доктор химических наук. Я основной упор сделаю на тех моментах, которые, как мне кажется, в общем-то, был прекрасный доклад. Очень хорошо освещено в отзывах и в выступлениях предыдущего оппонента, поэтому я постараюсь акцентировать те моменты, которые, как мне кажется, недостаточно чётко прозвучали.

Во-первых, я начну с актуальности и выбора, потому что сенсоры на пул глутатиона были до этого. В докладе они были показаны на зелёных белках. Здесь была поставлена конкретная цель – перейти к красным белкам. Я здесь хочу подчеркнуть один момент, который, в принципе, автор сказал, проговорил. Это написано в диссертации, но как-то акцент большой на этом поставлен не был. Всё дело в том, что вся та микроскопия, которую мы используем чаще всего, она страшно токсична для клеток. Если вы хотите работать долго с клеткой, а мы иногда работаем с клетками, это, правда, на животных, до месяца, то, вообще-то говоря, параметр токсичность исключить никоим образом нельзя. Если, конечно, ставить эксперимент по принципу «я положил клеточку, посмотрел, и через пару часов эту клеточку выбросил», то всё равно, какой свет использовать. Если же вы хотите наблюдать клетку в течение нескольких десятков часов и хотите, тем более, увидеть её деление, то, вообще-то говоря, вопрос токсичности света становится критичным. Действительно, зелёный свет, ну про ультрафиолет я вообще не говорю, это стерилизация, все прекрасно знают, ультрафиолетом стерилизуют. Но, вообще-то говоря, свет 400 нанометров, от 400 до 500, по-прежнему, крайне токсичен, и клетки погибают. Мы такие эксперименты ставили. И такие данные опубликованы в литературе, что клетки очень быстро погибают. И тот, кто следит за выживаемостью, ведёт витальную микроскопию живых клеток, не фиксированных, те эту проблему прекрасно знают. Поэтому вот эта задача – перейти в красную область, и взять те белки, а они на самом деле дороги не как красные, но самое главное – взять окно проницаемости. Это по-прежнему далеко от окна проницаемости в животных. На самом деле окно минимального возбуждения, минимального токсического воздействия, вот оно действительно находится в диапазоне между 500 и 600 нанометров. Там, как правило, в живых системах мало что поглощает. И этот свет наименее токсичен для клеток. Поэтому вот этот выбор направления, что нужно на красных белках сделать такой сенсор, сенсор, вообще-то говоря, вполне актуален для тех, кто занимается витальной микроскопией, витальными исследованиями, пытается исследовать длительное время.

Если дальше говорить о литобзоре, мне очень понравился литобзор. Особенно та его часть, которая была посвящена глутатиону. Часть, посвящённая цветным белкам, очень чётко сфокусирована только на то, что понадобится для объяснения сенсоров. А вот часть, посвящённая глутатиону, я не в отзыве, а в личной беседе рекомендовал диссертанту подумать и опубликовать такой обзор, потому что такого вот концентрированного изложения роли глутатиона я не встречал. Это всегда такая немножко размазанная область.

Теперь что касается сути создания сенсора. Да, ещё один момент, который она тоже сказала, мультипараметричность. Я вернусь к нему чуть позже. Что касается разработки сенсора, создания сенсора. К сожалению, конечно же, несмотря на то, что нам кажется, что мы сейчас о цветных белках знаем очень много, массив литературы просто неуправляемый. Как по структуре белковой его невозможно полностью смотреть, тем не менее, случай по-прежнему главный инструмент, поэтому скрининговая система, скрининговые тесты – это главный приём, который чаще всего приводит к успеху. Рациональный подход мы, конечно, используем. В принципе, автор положила в основу рациональный подход. То есть те рациональные сведения, которые уже были известны по другим сенсорам. Зелёным сенсорам, прежде всего. И использовала в основном эти подходы. Однако это не исключило, конечно, необходимость экспериментировать и перебирать как сами цветные белки, так и месторасположение в этих цветных белках,

месторасположение искусственного дисульфидного мостика, который туда вводится, и также иногда даже делать инсерции для того, чтобы проявился эффект. Это довольно интересный аспект всей работы. Всё-таки в основном, конечно же, сенсор, который был получен, он был получен не столько на основе рациональных конструкций, но это уже здесь говорилось и руководителем, сколько удивительным упорством диссертанта, который перебрал массу вариантов, и смог найти вариант, который оказался практически ценен и полезен. Я не буду перечислять её сенсорные конструкции, которые были получены, поскольку всё это уже достаточно подробно обсуждалось. Хочу обратить внимание на очень удачный приём, который использовал автор, это вот как раз демонстрация, что в коротких экспериментах можно использовать многопараметричность очень эффективно. Дело в том, что если смотреть с точки зрения микроскопии, то два сенсора не нужны, достаточно иметь один хороший сенсор, но очень качественный микроскоп и дальше идти с высоким разрешением вплоть до субдифракционной локализации и пытаться найти и понять, где он как локализован. А здесь, вот с моей точки зрения, автор как раз очень удачно применил многопараметричность. И он предпочёл связать разные локализации с разным цветом сенсора, что позволило ему, конечно, резко упростить микроскопный эксперимент и намного легче получить те данные. И, кстати, многопараметричность, с моей точки зрения, это одно из главных достоинств. Кроме низкой токсичности сенсора для витальной микроскопии. Второе важное достоинство – это возможность мультипараметрических измерений, реальных мультипараметрических. И вот на целой группе очень изящных и красивых экспериментов автор продемонстрировал, как это можно использовать. Что действительно ответ очень гетерогенен.

В общем, при дискуссии, обсуждении этого результата, я, опять же, не стал вносить это в отзыв, но в настоящее время очень активно развивающееся направление – это детекция, связано это было, прежде всего, с эффектом Варбурга уже в онкологии. И наиболее активно используется, вообще-то говоря, естественная флуоресценция флавинов и НАДН. По ним получается очень много информации достаточно ценной и важной. Но, опять же, что плохо, почему я тоже не стал особенно на этом акцентировать внимание, что этот свет тоже очень токсичен, который используется и для флавинов, и для НАДН. И для витальной микроскопии неэффективны.

Теперь, с моей точки зрения, что автор мог бы сделать, и то, что украсило бы эту работу – это вот пытаться всё-таки более детально разобраться в том, почему происходит образование дисульфидной связи, приводит к изменению параметров флуоресценции. Тем более, что к удачным, значимым изменениям она использовала три цветных белка. По крайней мере, в диссертации описаны эксперименты на трёх. Удачными оказались эксперименты только на одном единственном. На двух других они получились не слишком удачными, вообще ответ мог идти не в ту сторону, или вообще не реагируют. Поэтому вопрос – почему введение искусственной дисульфидной связи не всегда приводит к успеху, он, конечно же, довольно интересен. Тем более, что в экспериментальных данных самого автора намёк на то, где искать, он присутствует. Потому что, как оказалось, у неё эти данные приведены в литобзоре, в эксперименте, резко изменяется r_K хромофора. Не хватает единственно одного красивого эксперимента, с моей точки зрения, взять как раз окисленную структуру и промерить в окисленной структуре, где окажется r_K хромофора. И тогда это прояснило бы механизм изменения параметра флуоресценции. Хотя этот параметр вводится в такие бета-слои колеблющиеся,

которые вблизи хромофора, они также могут влиять ещё на один очень важный параметр – это на подвижность хромофора, потому что при возбуждении эта молекула имеет тенденцию – в нём может происходить цис-транс-изомеризация, довольно быстрое вращение, образование новых водородных связей. И, вообще-то говоря, это, конечно, более сложное. Потому что требует более сложной техники привлечения. Но, конечно, изучение механизмов, почему сигнал появился, он мог бы, возможно, автору помочь более чётко понять и построить стратегию, какие ещё сенсоры как можно улучшить, качество этого сенсора с тем, чтобы создать более эффективную систему. Более эффективную – имеется в виду с большей амплитудой ответа. Потому что амплитуда ответа пока ещё достаточно слабая, но она вполне детектируема. И вот как показал автор в многочисленных экспериментах, это достоверные измерения, которые позволяют чётко измерять все эти параметры изменения редокс-статуса в глутатионе. И таким образом расшифровывать достаточно такие тонкие детали механизмов. В принципе, эти замечания, с моей точки зрения, принципиально не влияют на проделанную работу и те достигнутые результаты, поэтому как у меня написано в отзыве, это вот фраза, она здесь присутствует, которую требует ВАК. Я её зачитаю. Что высказанные замечания не умаляют значение от полученных в работе результатов. По всем критериям данная работа отвечает требованиям, установленным положением о присуждении учёных степеней, утверждённом Постановлением правительства РФ от 24.09.13 года №842 с изменением Постановления правительства РФ от 21.04.16-го года №335, ещё там куча изменений, там написано у меня. И сама диссертация, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Были замечания, может быть, будет желание ответить?

Шохина Арина Геннадиевна: Что касается замечаний об изучении характера изменений рК при формировании дисульфидной связи рядом с хромофором. Действительно, исследования такого рода имели бы некоторую фундаментальную значимость. Они помогли бы улучшить как амплитуды ответа, так и ускорить дизайнирование конструкций при дальнейшей разработке похожих индикаторов. Однако же здесь есть несколько проблем, первая из которых – техническая. Дело в том, что для того, чтобы в полном объёме проводить такие эксперименты, необходимо иметь белок в полностью восстановленном или полностью окисленном состоянии. Однако же наш белок достаточно легко окисляется, очень легко окисляется, его сложно, практически невозможно в наших условиях получить в полностью восстановленном состоянии. Поэтому эксперименты такого рода в полном объёме нами не были проведены. Кроме этого основной задачей перед собой мы ставили не изучение фундаментальных основ наблюдаемого нами явления, а изучение того, насколько возможно применение полученного инструмента в разных системах *in vitro*, *in cellulo*, *in vivo*, поэтому мы сконцентрировали в основном свои усилия на этом.

Что касается изучения времён жизни флуоресценции и их вклада в наблюдаемые нами изменения флуоресценции. Это тоже очень интересный подход, который также можно использовать для разработки различных стратегий при конструировании таких индикаторов. И, в целом, мы открыты для сотрудничества. Поэтому белок есть, конструкции есть, и, если Вы готовы, то мы можем этим заняться для того, чтобы кому-то потом упростить жизнь.

Иванов Вадим Тихонович: Всё у Вас? Спасибо. Мы завершили такую заготовленную часть нашей процедуры защиты и переходим к общей дискуссии. Кто бы хотел поделиться соображениями по поводу – как голосовать? Прошу.

Белоусов Всеволод Владимирович: Добрый день, уважаемые коллеги! Я долго не буду отвлекать. Скажу следующее. Дмитрий Сергеевич уже сказал, что для него это первая работа, которую он защищает. В смысле, которой он руководил. А я, соответственно, должен сказать, что это первая работа, которую защищает человек, которого я могу назвать – такая научная внучка. Я стал дедушкой сегодня, потому что Дмитрий Сергеевич мой ученик. И как бы так сложилось. Это для меня означает, что фактически тот отдел, который здесь работает, там действительно уже есть самостоятельные группы, которые не требуют моего такого непосредственного постоянного внимания и развивают свои собственные научные направления. Я считаю, это очень здорово.

По поводу самой работы. Я хочу сказать, что в этих всех разработках биосенсоров бывают проекты, которые просто легко, вот задумал дизайн, сделал, получилось, протестировали и опубликовали очень какую-то там сильную статью. А некоторые проекты делаются, наоборот, сложно. И вот этот проект делался сложно. Потому что вообще с красными белками в качестве основы для биосенсоров особенно работать очень сложно, гораздо сложнее, чем с зелёными. Они не поддаются ничему, они мгновенно портятся, если с ними что-то делаешь. И этот проект такой. Его действительно Арина своим терпением, проходя через какие-то периоды отчаяния, она его довела до конца, до хорошей статьи. Действительно пока что из красных редокс-сенсоров самый хороший сенсор. И, я надеюсь, люди им будут пользоваться. С чем я всех нас и вас поздравляю. Предлагаю работу, конечно же, поддержать. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Я думаю, что мы Вас услышим. Есть ещё желающие выступить в дискуссии? На этом мы завершаем дискуссию. По-видимому, это именно так. И тогда я даю слово диссертанту для завершения обсуждения.

Шохина Арина Геннадиевна: Я хотела поблагодарить своего научного руководителя Дмитрия Сергеевича Билана, к которому я действительно пришла студенткой, и рядом с которым я росла как научный сотрудник. А также я благодарю своего второго научного руководителя Всеволода Владимировича Белоусова, который всегда предоставлял нам свободу действий и самовыражения, и множество возможностей для того, чтобы это реализовать. Также я хотела бы поблагодарить своих официальных оппонентов за проделанный труд по вычитке и анализу моей работы и по всем комментариям, которые вы любезно предложили мне обсудить, и над которыми предложили поразмышлять. Также я хотела бы поблагодарить коллектив лаборатории. Той лаборатории, в которой я работала всё это время, и всех лабораторий, которые выросли из отдела Сергея Анатольевича Лукьянова. Работать с вами было большим удовольствием. Спасибо.

Также я благодарю отдел аспирантуры: Татьяна Николаевна, Галина Алексеевна, Татьяна Игоревна, большое спасибо за помощь.

Я хотела бы отдельно поблагодарить свою школу, которую я когда-то окончила. 192-ю, которая по-прежнему продолжает меня поддерживать, спустя столько лет.

И отдельно я хотела бы сказать спасибо своей системе поддержки, своим друзьям. Большое спасибо, я очень ценю ваше участие.

Иванов Вадим Тихонович: Что ж, мы приближаемся к решающему действию – голосованию. Нам нужно избрать счётную комиссию. Она у меня уже тут в виде проекта лежит на столе. Без регалий и должностей, имён, отчеств – Долгих, Уткин, Олейников.

Три человека. Опыт показал, что это оптимальный размер счётной комиссии. Есть отводы, самоотводы какие-то? Давайте проголосуем. Кто «за»?

(Далее объявляется перерыв на голосование. Проводится тайное голосование)

Олейников Владимир Александрович: Вот результаты работы счётной комиссии. По диссертации. Диссертация Шохиной Арины Геннадиевны. Роздано бюллетеней 20, оказалось в урне 20. «За» - 19, «против» - 1, недействительных нет.

Иванов Вадим Тихонович: Давайте утвердим этот протокол тогда?

Олейников Владимир Александрович: Все «за» - да.

Иванов Вадим Тихонович: Утвердили.

(Проводится голосование по проекту заключения диссертационного совета. Принимается единогласно).

Председатель диссертационного совета,
д.х.н., академик РАН
Иванов Вадим Тихонович

