

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, руководителя лаборатории клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» Абрамова Андрея Юрьевича на диссертацию Билана Дмитрия Сергеевича на тему «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований», представленной к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича, представляемая на соискание степени доктора биологических наук, посвящена созданию новых и передовых молекулярных инструментов для измерения изменений окислительно-восстановительного баланса и изучение в моделях *in vivo* с помощью генетически кодируемых биосенсоров изменений в ответ на гипоксию/реоксигенацию и воспаление. Изменение в окислительно-восстановительном балансе клеток приводит к запуску редокс сигнала или окислительному стрессу, приводящему к патологии. Редокс сигнализация быстрый процесс, лежащий в основе многих физиологических процессов. Ключевая роль окислительного стресса в механизме патологии сердечно сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний не вызывает сомнений и показана в большом количестве исследований. Тем не менее, учитывая короткое время жизни некоторых активных форм кислорода (1 наносекунда), современные методы исследования не позволяют производить селективные измерения как производства активных форм кислорода и других свободных радикалов. В связи с этим, огромный интерес представляют работы по созданию и использованию новых молекулярных зондов для изучения редокс процессов что может помочь определению механизма возникновения ряда заболеваний и развитию новых лекарственных препаратов для лечения и профилактики этих болезней.

Научная новизна результатов исследования. Главными результатами представленной диссертационной работы является создание новых генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров, а также

применение подобных инструментов в новых биологических моделях. Разработан и показан первый редокс-чувствительный белок с красной эмиссией флуоресценции, что расширяет спектральную палитру редокс биосенсоров. С помощью комбинации разработанных биосенсоров Grx1-roCherry (GSSG/2GSH), SoNar (NAD⁺/NADH), SypHer-2 (pH) показано, что дихлорацетат, в цитозоле клеток HeLa Kyoto вызывает окисление пула глутатиона и наоборот восстановление NAD, в то время как клетках с нормальным метаболизмом на примере HEK293 такой эффект не обнаружен. Производство H₂O₂ в разных внутриклеточных компартментах клеток с помощью фермента оксидазы D-аминокислот (DAAO) показало различие в окислении цитозоля и матрикса митохондрий в различных клетках. Диссертантом разработан первый в мире генетически кодируемый биосенсор для регистрации гипогалогенных кислот на основе транскрипционного фактора NemR из E.coli и интегрированного в его структуру флуоресцентного белка cpYFP (Nurocrates). Биосенсоры Nurocrates и NuPer-Red позволили впервые одновременно измерить динамику гипогалогенного стресса и H₂O₂ в тканях рыб *Danio rerio* в условиях развития воспалительной реакции, вызванной механическим повреждением.

С помощью биосенсора NuPer7 и технологии оптоволоконного нейроинтерфейса впервые показана *in vivo* динамика концентрации H₂O₂ в тканях мозга крыс с первых секунд развития ишемического инсульта как в нейронах, так и кардиомицитах.

Научно-практическая и теоретическая значимость. Диссертантом получены экспериментальные данные, с помощью генетически кодируемых биосенсоров говорящие о различиях в молекулярных механизмах поддержания окислительно-восстановительного баланса различного типа клеток (онкологических по сравнению с контрольными), изменения редокс баланса при ишемии / реоксигенации клеток головного мозга и кардиомицитов, измерена пространственно-временная динамика гипогалогенного стресса в бактериях, фагоцитируемых человеческими нейтрофилами в культуре, а также в тканях рыб *D.rerio* при воспалении, вызванном механическим повреждением. На основе экспериментальных данных была разработано новое представление о процессах редокс изменений *in vivo* в ответ на различные стимулы.

Практическая значимость представленной работы состоит в получении двух новых генетически кодируемых биосенсоров Grx1-roCherry и Hupocrates, которые могут быть исследованы для экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo* и *ex vivo*.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа характеризуется хорошей структурированностью и ясностью изложения.

Диссертационное исследование Д.С. Билана состоит из введения, основного содержания (в виде описания использованных материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 905 источников. Работа изложена на 351 страницах.

Во введении кратко изложено современное состояние научных исследований по изучаемой проблеме, изложены цели и задачи работы. Задачи определяют направленность всего исследования. Так же кратко изложены методология и методы диссертационного исследования.

В основной части обобщены и кратко изложены как данные литературы по проблеме, исследуемой в рамках диссертационной работы, так и кратко описаны работы диссертанта и публикации, вынесенные для подтверждения основной научной линии диссертации.

Автором был проведен тщательный статистический анализ полученных данных, подтвержденных публикациями в рецензируемых научных журналах, что позволяет с высоким доверием относиться к выводам, сделанным по результатам работы.

В заключении и выводах автор суммирует полученные результаты и прогнозирует дальнейшее развитие этой темы

Замечания по диссертации

В качестве замечаний считаю необходимым отметить следующее:

1. Учитывая высокую вовлеченность измеряемых автором H_2O_2 и гипогалогенных кислот, возникает вопрос о пороге, который приводит к окислительному стрессу. Проводились или планировались ли одновременные измерения производства гидроперекиси и запуска апоптоза или других (за исключением уровня GSH) маркеров окислительного стресса?

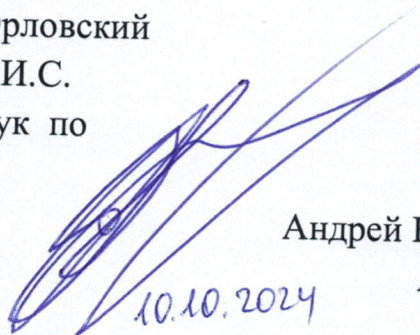
Указанное замечание не является принципиальным и не снижает общего высокого уровня научной и практической значимости представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований» представляет собой самостоятельное и законченное исследование, включающее обширный материал по развитию новых биосенсоров для редокс биологии и изучению окислительно-восстановительного баланса различных клеток *in vivo*. Результаты работы представляют большой научный интерес и формируют новое направление исследований редокс процессов.

Диссертация удовлетворяет всем требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. №335; 02.08. 2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 №426; 11.09. 2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №;101; 25.01.2024 г. №62 предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Билан Дмитрий Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Руководитель лаборатории клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», доктор биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика



10.10.2024

Андрей Юрьевич
Абрамов

Подпись Абрамова А.Ю. заверяю:

И.о. проректора по научно-технологической деятельности и аттестации научных кадров
ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»



Сергей Юрьевич
Радченко