

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Билана Дмитрия Сергеевича на тему "Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований", представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

В последние годы бурно развивается новое направление в биологии – редокс-биология. Публикуется огромное количество работ посвящённых исследованиям активных форм кислорода (АФК), азота (АФА) и серы (АФС). Сформулирована концепция современной редокс-биологии, выделяющая понятия "окислительного стресса" и "окислительного эустресса", приводящих к противоположным физиологическим последствиям. В результате кардинально пересмотрены устоявшиеся ранее представления об исключительно негативной, повреждающей роли АФК, АФА и АФС и доказано их важнейшее значение в качестве редокс-регуляторов в функционировании биологических организмов.

Фундаментально важный прорыв в области ред-окс биологии произошёл с появлением флуоресцентных белков и создаваемых на их основе биосенсоров. Создана обширная коллекция биосенсоров для исследования ряда физиологически важных параметров клеток, пространственно-временное анализ которых был ранее недоступен. Однако, насущной задачей является создание новых биосенсоров для анализа редокс-параметров клеток в норме и при патологических состояниях.

Для некоторых заболеваний эффективная терапия затруднена отсутствием, или неполной картиной, наших знаний о молекулярных механизмах приводящих к развитию патологических состояний. Главным повреждающим фактором при ишемии тканей головного мозга и сердца, является окислительный стресс. Доказано, что в этих процессах важную роль играют АФК. Однако, системы, которые вносят основной вклад в образование АФК требуют своего выяснения.

Поэтому диссертационная работа Билана Д.С., целью которой является разработка новых генетически кодируемых редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков, а также исследование динамики редокс-параметров в моделях *in vivo* является несомненно важной и актуальной. Востребованность работы усиливается ещё тем, что в ней сочетается как создание новых перспективных биосенсоров, так их практическое использование.

Диссертационная работа представляет собой тщательно оформленный труд, построенный, в общем, традиционным образом и включает: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы, включающий более 900 источников, а также более 80 рисунков и таблицы. Список источников особенно впечатляет и указывает на скрупулёзность, на эрудированность и глубокие знания автора в исследуемой области.

Основное изложение диссертационной работы предваряет раздел "Общая характеристика работы", в котором сформулированы актуальность, цели и задачи работы, её научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Кроме того, кратко обоснована методология исследования, а также изложены основные положения, выносимые на защиту. Важным является тот факт, что результаты работы были представлены на многих международных и всероссийских съездах, научных школах и конференциях.

В главе "Обзор литературы" подробно представлены различные типы биосенсоров. В первом разделе этой главы автор сосредоточился на низкомолекулярных редокс-активных компонентах, их роли в клетках, основных путях образования и систем контроля. Представлено подробное изложение структуры и функции активных форм кислорода, галогенов, азота и серы. Второй раздел посвящён анализу всех доступных на сегодняшний день инструментов для разработки и применения генетически кодируемых биосенсоров на базе флуоресцентных белков, которые обеспечивают визуализацию редокс-процессов. Проведено подробное описание и анализ свойств различных типов флуоресцентных биосенсоров, приводится большое количество работ, выполненных в последние годы в этом направлении. Представленная в конце обзора таблица, редокс-биосенсоров является уникальным справочником, в котором указаны основные свойства, достоинства и недостатки различных биосенсоров. Эта информация, может служить важным источником для научного сообщества, как справочник при выборе необходимых биосенсоров.

В общем, прочтение обзора, опирающегося на большой объем современных экспериментальных и теоретических работ, критическое отношение автора к характеристикам описанных биосенсоров, а также результатам учёных, работающих в этой области, указывает на высокую научную эрудицию автора. Обзор литературы, написан очень хорошим, языком, ясно структурирован и очень наглядно иллюстрирован.

О высоком научно-методическом уровне выполненной работы и полученных автором результатов, свидетельствует применение широкого спектра современных методов молекулярной биологии, культуры ткани, экспрессии и анализа белков, рамановской микроспектрометрии, спектральной микроскопии и других методов, используемых в исследованиях. Глава "Материалы и методы" состоит из нескольких разделов, в которых изложены общие подходы, используемые при разработках и применении биосенсоров, а также конкретная информация по получению молекулярно-генетических конструкций редокс-чувствительных белков. Необходимо отметить разнообразие используемого в работе экспериментального материала, в частности, рыбы *Danio rerio*, первичные клеточные культуры нейронов мышей и кардиомиоциты крыс.

В главе "Результаты и обсуждение" подробно изложены все этапы исследовательской работы. В первой части описаны подходы к разработке новых редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков, идеи дизайна новых молекулярных инструментов, анализ их характеристик и свойств, которые были детально исследовали в системах *in vitro* и клеточных культурах. Во второй части описаны подходы применения генетически кодируемых биосенсоров на животных моделях *in vivo*. Также представлено использование созданных биосенсоров для исследования редокс-процессов при таких патологических состояниях, как ишемия, диабет и воспаление.

Следует отметить масштаб и оригинальность пионерских разработок. Во-первых, был создан первый редокс-чувствительный красный флуоресцентный белок с канонической для данного семейства биосенсоров структурой. Это позволило расширить спектральную палитру семейства биосенсоров и создать инструмент, обеспечивающий возможность для мультипараметрической регистрации сигналов, т.е. в комбинации биосенсорами, работающими на других длинах волн. Во-вторых, очень важным научным достижением является создание и скрининг версий биосенсора для регистрации гипогалогенных кислот. На основе *srYFP* был создан не имеющий аналогов в мире генетически кодируемый биосенсор, *Hypocrates*, с помощью которого была проанализирована динамика гипогалогенного стресса в тканях рыб *Danio rerio in vivo* при развитии воспалительной реакции, вызванной механическим повреждением. Более того, на примере контрольной версии *Hypocrates* впервые расшифрована пространственная структура редокс-биосенсора. В-третьих, созданный биосенсор *Grx1-roCherry* представляет собой первый в истории пример редокс-чувствительного RFP с канонической для данного семейства биосенсоров структурой. В-четвёртых, с помощью созданного биосенсора *HuPer7* и технологии оптоволоконного нейроинтерфейса, впервые была исследована *in vivo* динамика концентрации H_2O_2 в тканях мозга крыс на начальных стадиях развития ишемического инсульта.

Важно подчеркнуть, что результаты диссертационной работы имеют большую практическую значимость. Разработанный подход на основе оптоволоконного интерфейса и генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров позволяет регистрировать реальную динамику АФК в тканях мозга с первых секунд развития ишемического повреждения. Ранее такие измерения были недоступны. Созданные новые генетически кодируемые биосенсоры *Grx1-roCherry* и *Hypocrates*, могут быть использованы исследователями для реализации многих экспериментальных задач в биологических моделях разной степени сложности: от изолированных клеток до целых организмов.

Несмотря на прекрасное впечатление, которое производит работа Билана Д.С., имеется несколько замечаний и вопросов:

1. Стр. 186. Вы показали, что в эукариотических клетках *Grx1-roKate* окисляется необратимо, а при использовании *Grx1-roCherry* наблюдали обратимое изменение сигнала. Вы пишете, что это наблюдалось "...по не установленной нами причине,,,".

Из сравнения рис. 38 А и Б видно, что в случае использования биосенсора Grx1-roKate была использована концентрация H_2O_2 в 5 раз более высокая, чем в случае измерения с помощью Grx1-roCherry. Не может это быть причиной наблюдаемых различий?

2. Стр. 189. Текст гласит: " Мы подтвердили, что белок Grx1-roCherry действительно не чувствителен к H_2O_2 вплоть до высоких концентраций 500 мкМ ". В этом случае непонятно как согласовать это с результатом, представленным на рис. 38Б и 42 где наблюдались большие ответы при аппликации 150 мкМ H_2O_2 ?

Более того, из концентрационной зависимости на рис.41, что сенсор замечательно отвечает на концентрации H_2O_2 ,от 30 мкМ с насыщением \approx 150 мкМ. По- видимому, ошибка в изложении.

3. Стр. 199. Результаты показывают, что при направленной продукции H_2O_2 в клетках HeLa Kyoto, окислительные процессы происходят исключительно в матриксе митохондрий и не распространяются на цитозоль, в то время как в нейронах изменения наблюдаются в обоих компартментах. Вы показали, что добавление ингибитора TrxR в клетки HeLa Kyoto приводит к появлению окисления не только в митохондриях, но и цитозоле.

Изменяло ли добавление ауранофина базовый уровень H_2O_2 в этих клетках? Могло ли в нейронах добавление ингибитора TrxR приводить изменению редокс-статуса, вызванного действием оксидазы D-аминокислот (DAAO)?

4. Рис. 67. Из графика зависимости флуоресцентного сигнала SypHer3s (F490/F405) от значения pH, следует, что динамический диапазон этого биосенсора сильно сдвинут в щелочную сторону, По этой причине, при анализе сдвигов pH в кислую сторону возможно использование только очень небольшого диапазона.

Можно ли модифицировать биосенсор, чтобы сдвинуть чувствительность в сторону более кислых значений?

5. В общем текст тщательно выверен, однако есть несколько опечаток.

Стр.37 "Было предложено",

Стр. 79 "Синтеза"

Стр. 96 "хромофоре"

Стр. 189 " позволила"

Приведённые выше замечания и вопросы не носят принципиального характера и не уменьшают значимость полученных результатов, не меняют превосходного впечатления о диссертационной работе, не снижают её высокую оценку. Исследование Билана Д.С. выполнено на очень качественном, многоплановом и надёжном методическом уровне, результаты сопровождаются ясными иллюстрациями и необходимыми схемами. Содержание диссертации в полной мере соответствует специальности 1.5.3 – молекулярная биология. Автореферат написан ясно, информативно, в хорошем литературном стиле и полностью отражает основное содержание диссертационной работы.

Таким образом, диссертационная работа Билана Дмитрия Сергеевича на тему «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований» отвечает всем требованиям (в том числе п. 9), 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; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 № 62), а ее автор, Билан Дмитрий Сергеевич, несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

30 сентября, 2024 г.

Официальный оппонент:

Профессор Казанского Государственного Медицинского Университета
Доктор биологических наук
Брежестовский Пётр Дмитриевич

Тел. +7 968 499 77 16
Email: pbreges@gmail.com



Подпись <u>д.д.и. профессоре</u> <u>Брежестовского Петра Дмитриевича</u>
Учёный секретарь Учёного Совета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, д.м.н. <u>И.Г. Мустафин</u>
« 30 » 09 2024 г.