

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Билана Дмитрия Сергеевича «Редокс-биосенсоры на основе флуоресцентных белков для *in vivo* исследований», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности – 1.5.3. – молекулярная биология

На протяжении долгих лет биологическую роль активных форм кислорода (АФК) видели в их токсическом действии. Известно, что при увеличении уровня АФК в организме развивается окислительный стресс, который ассоциирован с развитием многих заболеваний человека, включая атеросклероз, цирроз печени, катаракту, артриты, ишемическую болезнь сердца, бронхиальную астму, гепатит, диабет. Патологические изменения в клетках могут запускаться не только при повышении концентрации окислителей, но и при увеличении концентрации антиоксидантов. Сегодня считается обоснованной также сигнально-регуляторная роль АФК, убедительно доказано ведущая роль редокс сигнализации во многих внутриклеточных процессах. Часто сведения о мишенях действия редокс-молекул неоднозначны и противоречивы. Одни и те же концентрации внеклеточных АФК индуцируют различные типы клеточных ответов. Почти все исследования в редокс биологии тесно связаны с развитием инструментов для исследования концентрации и локализации АФК. Судя по автореферату, диссертационное исследование Д.С. Билана направлено на разработку новых генетически кодируемых редокс-биосенсоров на основе флуоресцентных белков и оптимизацию способов их применения. Очевидно, что разработка способов измерения концентрации и локализации АФК в микронном диапазоне расстояний является важной и актуальной задачей.

В результате проведенных Д.С. Биланом исследований разработан генетически кодируемый биосенсор Grx1-roCherry – редокс-чувствительный красный флуоресцентный белок. На основе белка NemR из *E. coli*, в структуру которого интегрировали сrYFP, разработан генетически кодируемый биосенсор Нурocrates для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. Большая часть работы посвящена оптимизации применения сенсоров, так в режиме многофотонного возбуждения флуоресценции охарактеризованы биосенсоры SypHer3s (для регистрации pH), НуPer7 (H_2O_2), Нурocrates (гипогалогенные кислоты и их производные). Визуализирована динамика изменения концентраций одновременно H_2O_2 и гипогалогенного стресса в тканях аквариумной рыбки Данио-рерио при воспалении, вызванном механическим повреждением. При гипоксии в клетках этих рыб продукция пероксида водорода обнаружена исключительно в матриксе митохондрий, при этом пероксид водорода не диффундирует в цитозоль и при реоксигенации нейтрализуется в том же компартменте. С помощью НуPer7 и оптоволоконной спектроскопии *in vivo* проведена визуализация динамика изменения концентрации H_2O_2 в матриксе митохондрий нейронов крыс при ишемии. При помощи комбинационного рассеяния показано, что неонатальные кардиомиоциты содержат меньше митохондрий. В целом, решение поставленных задач в диссертационной работе проведено на высоком уровне и глубоком знании методов экспериментальной биологии. Автореферат дает исчерпывающее представление о проделанной работе, результаты которой были представлены в более чем 40 статьях в авторитетных журналах. Качество статей не вызывает сомнения, я сужу статьям в журнале FRBM, которые я видел и принимал участие в рецензировании.

В качестве замечания хотелось бы отметить наличие ошибок в терминологии, например мультифотонный вместо многофотонный; рамановская микроспектрометрия вместо спектроскопии

комбинационного рассеяния. В некоторых предложениях пропущены слова, очень часто не пишется словосочетание «изменение концентрации». Положения выносимые на защиту сформулированы в стиле «Разработано что-то» или «охарактеризовано что-то». Сам автореферат имеет примерно в 2 раза больший объем, чем рекомендует ВАК РФ. По существу, предлагаю обсудить в процессе защиты следующие логические конструкции, не лучшим образом отраженные в автореферате, но вероятно детально описанные в статьях диссертанта:

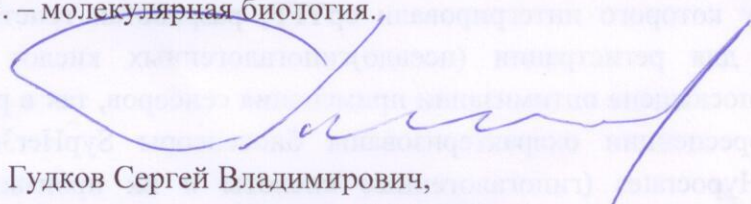
- В положении 5 выносимом на защиту автор утверждает, что «В очаге инсульта астроциты характеризуются более окисленным состоянием по сравнению с нейронам». Мне кажется это довольно давно известное утверждение, мне кажется, диссертант должен пояснить, что конкретно он имел в виду.

- Автор разработал довольно интересные инструменты для оценки параметров окислительного стресса, некоторые «первые в мировой» истории, однако в автореферате в явном виде не проведен анализ и сравнение разработок автора с существующим инструментарием. Мне кажется, в процессе защиты имеет смысл обсудить данный вопрос.

- В автореферате приведено некоторое количество спектров, однако все спектры представлены в относительных единицах. При этом читатели не могут сравнивать спектры между собой. В идеале хотелось бы узнать квантовую эффективность разработок автора. В минимальном режиме можно озвучить какие-либо ориентиры позволяющие проводить сравнение спектров хотя бы по порядкам величин.

Поставленные вопросы не влияют на высокую оценку диссертационной работы Билана Д.С.

Считаю, что диссертационная работа Дмитрия Сергеевича Билана по объему материала, рациональности методического подхода, научной новизне полученных результатов, их изложению, теоретической и практической значимости полностью соответствует критериям, предъявляемым к докторским диссертациям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013, а сам автор заслуживает присуждения ему учёной степени доктора биологических наук по специальности – 1.5.3. – молекулярная биология.


Гудков Сергей Владимирович,
д.б.н. - по специальности 1.5.2. – биофизика,
профессор - по специальности 1.5.2. – биофизика,
Профессор РАН

Руководитель Центра биофотоники, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» ИОФ РАН,

119991 г. Москва, ул. Вавилова, 38 (ИОФ РАН),

Телефон: +7 (499) 503-8734

Email: office@gpi.ru

Я, Гудков Сергей Владимирович, даю согласие на включение и дальнейшую обработку своих персональных данных при подготовке документов аттестационного дела соискателя учёной степени.

