

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

**СТЕНОГРАММА**

**Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН  
02 марта 2022 года**

**Защита диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук**

**Богдановой Юлии Антоновны**

**По теме: «Исследование редокс-зависимых процессов в живых системах с помощью  
хемогенетических инструментов»**

**Специальность 1.5.3 – «Молекулярная биология»**

Москва - 2022

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 02 марта 2022 года

Председатель  
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

- |                            |                                  |         |
|----------------------------|----------------------------------|---------|
| 1. Академик РАН, д.х.н.    | Иванов Вадим Тихонович           | (1.4.9) |
| 2. Д.физ.-мат.н.           | Олейников Владимир Александрович | (1.5.6) |
| 3. Д.б.н.                  | Ажикина Татьяна Леодоровна       | (1.5.3) |
| 4. Д.х.н.                  | Безуглов Владимир Виленович      | (1.5.6) |
| 5. Д.х.н.                  | Белогуров Алексей Анатольевич    | (1.5.3) |
| 6. Д.х.н.                  | Бовин Николай Владимирович       | (1.5.6) |
| 7. Академик РАН, д.х.н.    | Габибов Александр Габибович      | (1.5.6) |
| 8. Академик РАН, д.б.н.    | Деев Сергей Михайлович           | (1.5.3) |
| 9. Д.б.н.                  | Долгих Дмитрий Александрович     | (1.5.3) |
| 10. Член-корр. РАН, д.б.н. | Завриев Сергей Кириакович        | (1.5.6) |
| 11. Д.б.н.                 | Зарайский Андрей Георгиевич      | (1.5.3) |
| 12. Д.б.н.                 | Лебедев Юрий Борисович           | (1.5.3) |
| 13. Академик РАН, д.х.н.   | Мирошников Анатолий Иванович     | (1.5.6) |
| 14. Д.х.н.                 | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 15. Д.б.н.                 | Сапожников Александр Михайлович  | (1.5.3) |
| 16. Д.х.н.                 | Смирнов Иван Витальевич          | (1.4.9) |
| 17. Член-корр. РАН, д.б.н. | Тоневицкий Александр Григорьевич | (1.5.6) |
| 18. Д.х.н.                 | Уткин Юрий Николаевич            | (1.4.9) |
| 19. Член-корр. РАН, д.х.н. | Цетлин Виктор Ионович            | (1.4.9) |
| 20. Д.х.н.                 | Шахпаронов Михаил Иванович       | (1.4.9) |
| 21. Д.х.н.                 | Ямпольский Илья Викторович       | (1.4.9) |

**Иванов В.Т., председатель:**

Первая защита: Богданова Юлия Антоновна. Владимир Александрович, материалы личного дела, пожалуйста.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Да, значит, материалы личного дела. Это окончание биологического факультета МГУ имени Ломоносова по специальности «Биохимия», 2015й год. В 2015м году техник-лаборант, с 2015 по 2016 младший научный сотрудник, по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных технологий нашего института ИБХ РАН. Еще также с 2015 по 2019 поступила в аспирантуру и окончила ее. Кандидатский экзамен по специальности «Молекулярная биология» сдан на «отлично». Работа выполнена в лаборатории молекулярных технологий отдела метаболизма и редокс биологии нашего института. Научный руководитель – Всеволод Вадимович Белоусов, завлаборатории этой. По теме диссертации опубликовано 3 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя: 28 декабря 2021-го года, и все необходимые документы в деле есть.

**Иванов В.Т., председатель:**

Какие-то вопросы, замечания, уточнения? Обычно не бывает. Сегодня не исключение. Спасибо. Даем слово диссертанту. Юлия Антоновна, 20 минут.

**Богданова Ю.А., соискатель:**

*(Излагает основные положения диссертационной работы)*

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо за доклад, переходим к обсуждению. Возникли ли вопросы? Да, прошу. Просьба в микрофон задавать вопросы, потому что идет запись.

**Лукьянов К.А.:**

Здравствуйте. А можно вопрос про вот эти градиенты внутриклеточные.

Вы выбрали локализацию внутри митохондрий, что, на мой взгляд, несколько усложняет систему, потому что пероксид должен еще внутрь войти. А митохондрии около ядра и на периферии могут функционально отличаться. Не проще ли было закрепить НуРер на

цитоскелете, либо на внешней мембране митохондрии, наружу экспонированной в цитозоль?

**Богданова Ю.А., соискатель:**

Да, если честно, у нас изначально был конструктор, который имел митохондриальную локализацию, и мы начали работать с ним, параллельно готовя конструктор с фьюзом с кератином. И в случае фьюза с кератином мы получили, в общем-то, тот же самый результат, но у нас уже было получено довольно много данных на фьюзе, ну, на митохондриально локализованной. Мы просто продолжили работать в эту сторону.

**Лукьянов К.А.:**

Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:**

Еще вопросы? Доклад был достаточно четким и понятным. Не вижу вопросов. Тогда отдыхайте. Будем заслушивать мнение, тут, ряда инстанций, ряда рецензентов по поводу вашей работы. Сейчас тот момент, когда я имею право дать слово научному руководителю, если он хочет охарактеризовать диссертанта. Есть Всеволод Вадимович? Есть, да. Есть желание. Слушаем внимательно.

**Белоусов В.В., руководитель:**

Коллеги, добрый день. Я буду краток по традиции. Значит, что мне хочется сказать про диссертанта. То есть, вот, я, как бы, думаю. Иногда думаешь, а, вот, что сказать про человека, да. Мне в данном случае приходит такая аналогия, вот, есть, например, такая область, там, геология, да, вот. Ну, там надо найти какое-то полезное ископаемое и дальше его добывать. И, вот, есть люди, которые ищут и открывают какие-то, условно, месторождения каких-то полезных ископаемых. А есть потом люди, которые роют шахту, которые, значит, добывают там это золото или, я не знаю, алюминий, или еще что-то. И, вот, Юлия Антоновна, она относится к первому типу исследователей. Она – тот человек, который в нашей лаборатории, можно так сказать, основал несколько фактических направлений, которые потом были фактически развиты в такие шахты, в такие целые ветви. То есть, сейчас куча людей занимается тем, что в разных органах и тканях моделируют окислительный стресс с помощью этих моделей. Мы знаем в итоге про эти альтернативные субстраты, которые мы можем использовать. Градиенты вот эти пероксида водорода, которые здесь как раз крутятся очень правильным образом – это тоже целая область, которая сейчас привела вообще во всем мире к появлению уже нескольких статей, которые на этой технологии основаны. То есть, на самом деле, все это

благодаря, в общем-то, тому, что кто-то должен был прийти и эту шахту открыть, это месторождение. На самом деле, фактически, Юлия Антоновна – такой классический эксплорер. Мне фактически больше нечего добавить. Понятно, что у нас весь коллектив состоит из дружественных людей, которые друг другу помогают. Это все банальные слова, я не хочу на них долго останавливаться. Хочу просто пожелать Юлии Антоновне и дальше развиваться, открывать новые направления, в общем, в том же духе продолжать свою научную карьеру. Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. Это все будет учтено при голосовании. Далее у нас несколько письменных отзывов, которые мы должны заслушать.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Да, во-первых, заключение организации, где выполнялась работа, а работа выполнялась в нашем институте, как раз в лаборатории, научный руководитель как раз только что выступил. И заключение организации, рассмотрено на соответствующем семинаре, отмечено, что важным протоколно является то, что тема была утверждена у нас на нашем совете еще в 2021 году 6 октября. И далее само заключение. *(Зачитывает заключение организации, где выполнена диссертация).*

Во-первых, актуальность. Подчеркивается, что активные формы кислорода участвуют во множестве клеточных процессов, и они очень важны. Одним из подходов в изучении функции является активизация их сайтов внутриклеточными источниками. Этот подход часто сопровождается грубым вмешательством в функционирование клетки. Ну, здесь предложен более мягкий подход, где использован фермент на основе оксидазы D-аминокислот, дрожжевой, вот это самое DAAO. И, соответственно, важным является, подчеркивается актуальность, то, что авторы увидели огромное поле для применения вот это DAAO в различных живых системах, и для решения вопросов редокс биологии использовали вот этот вот подход. Научная новизна – то, что протестированы были различные субстраты, были созданы генетические конструкторы для направленной генерации пероксида водорода. Далее, на основании полученных результатов этой работы, является конструкторов DAAO во фьюзе с биосенсором НуРег была показана возможность использования хемогенетического генератора в кардиомиоцитах. Далее, практическая значимость подчеркнута, которая заключает в себе возможность разработки и тестирования ингибиторов и активаторов различных антиоксидантных систем. Степень достоверности. Подчеркнуто, что очень все результаты достоверны, поскольку использованы самые современные методы и подходы. Личное участие – то, что работы по

теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии. На основании результатов диссертационной работы опубликованы три статьи в хороших рецензируемых журналах. Прошла проверку на оригинальность эта работа.

Ну, и общее заключение – то, что диссертация рекомендована к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Заключение принято на заседании открытого межлабораторного семинара отдела метаболизма и редокс биологии, на котором присутствовал 21 человек, все за. Подписано, соответственно, председателем семинара, руководителем группы редокс биологии, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником Подгорным О.В. И заключение утверждено директором нашего института, Александром Габибовичем Габибовым, академиком. Это что касается организации, где выполнялась работа.

Теперь ведущая организация. *(Зачитывает отзыв ведущей организации).*

Ведущей организацией является Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, федерального медико-биологического агентства. Отзыв полностью положительный. Также подчеркивается актуальность темы выполненной работы. Подчеркивается, что актуальность в том, что ощущается в настоящее время острая нехватка инструментов, позволяющих изучать функции отдельных активных форм кислорода в норме и патологии. Одному из таких инструментов посвящена данная работа, речь идет о том самом DAAO, о котором мы сегодня много уже слышали.

По общей характеристике. 151 страница. Здесь меня тоже поразило, что ссылки на 346 литературных источников. То есть, такое огромное количество. Введение. Описаны актуальность, новизна, степень разработанности темы. Глава 1 – обзор литературы, подчеркивается, что написан хорошим языком, включает информацию, необходимую для дальнейшего понимания результатов проведенных исследований. Глава 2 – материалы и методы. Как уже отмечалось в заключении организации, подробно описаны все использованные в работах методы, и методы современные. Это как раз отвечает, подчеркивает и определяет достоверность результатов полученных. Глава 3 – результаты обсуждения. Я не буду зачитывать полностью. Я просто хочу сказать, что вот здесь вот прописано: полученные результаты расширяют наше понимание механизмов редокс процессов в клетках различного типа. Научная новизна, здесь подчеркивается, есть слова автора: впервые удалось показать, что D-норвалин может быть использован в качестве эффективного субстрата для генерации пероксида водорода при помощи DAAO. Автору удалось существенно расширить область применения хемогенетических генераторов пероксида водорода. Опять же, достоверность подчеркивается.

К диссертации принципиальных замечаний нет, однако есть некоторые терминологические неточности, которые требуют пояснения. Так автор определяет активные формы кислорода АФК как химически активные соединения, содержащие кислород, страница 9 в диссертации. Это слишком упрощенное и устаревшее определение. Почему? Всем известна другая группа реакционных соединений, а именно активные формы азота (АФА), например, NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и другие. Как видно, все они содержат кислород, однако их выделяют в отдельную группу АФА. То же самое можно сказать об активных формах галогенов, АФГ. HOCl, Br и другие. Они также содержат кислород. Отличие классических АФК от АФА и АФГ состоит в том, что в них реакционность определяется именно атомом кислорода. В АФА – атомом азота, в АФГ – атомом галогена. Именно эти атомы в указанных соединениях вступают в окислительно-восстановительный акт, принимая электроны. Поэтому правильнее к АФК относить те кислородсодержащие соединения, реакционность которых определяется именно атомом кислорода. В связи с этим следует заметить, что отнесения NO, а также гипохлорита и гипобромита к АФК, как это сделано в диссертации, является неверным. Но указанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют, как обычно.

Ну, и в заключении написано, что по актуальности, по объему, по новизне диссертация соответствует Положению о присуждении ученых степеней. Сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Отзыв составлен, обсужден и одобрен единогласно на заседании отдела клеточной биологии этого института. Составлен 7 февраля заместителем генерального директора по научной работе доктором биологических наук Лазаревым Василием Николаевичем. И отзыв этот утвержден ВРИО генерального директора федерального научного клинического центра физ.-хим. медицины Марией Андреевной Лагарьковой, член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор.

**Иванов В.Т., председатель:**

Есть возможность ответить на замечание, которое было сформулировано. Или просто вы согласны с ним?

**Богданова Ю.А., соискатель:**

Я согласна с ним.

**Иванов В.Т., председатель:**

Вы согласны. А есть ли у нас отзывы на автореферат, на диссертацию?

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Нет, не поступили.

**Иванов В.Т., председатель:**

Таковых нет. Тогда у нас есть все возможности перейти к выслушиванию официальных оппонентов. Профессор Плотников Егор Юрьевич, Институт физико-химической биологии имени Белозерского, МГУ.

**Плотников Е.Ю., оппонент:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).*

Добрый день, уважаемые коллеги. На самом деле всегда очень приятно знакомиться с работами этого коллектива. В том числе знакомиться подробно, что позволяет оппонирование диссертациям, а не только из статей. Из диссертации всегда это более глубоко и подробно можно вникнуть, и понять. Здесь уже тоже это отмечалось. Я как человек, занимающийся в том числе редокс биологией, с такой физиологической точки зрения, я также отмечу, что роль активных форм кислорода в патологических физиологических сигнальных процессах, она в последние несколько десятилетий очень активно исследуется, все понимают огромное значение этих активных форм кислорода. Но при этом остается множество белых пятен в этих исследованиях и в нашем понимании этой роли, в том числе и именно потому, что наблюдается некоторый недостаток, как способов детекции различных типов АФК, здесь тоже уже упоминалось, что они достаточно разнообразны по своей природе, радикальные, не радикальные, так и инструментов, которые позволяют направлено генерировать эти активные формы кислорода, причем, желательно, чтобы генерировать внутри клетки, внутри органеллы. Еще совсем замечательно, если бы это была направленная генерация, соответственно, в каких-то органеллах или в каких-то конкретных клетках, в идеале, в конкретных тканях и органах. То есть, наличие таких инструментов, оно, конечно, очень сильно расширяет возможности не только редокс биологии как таковой, но и вообще клеточной биологии и физиологии, на современном уровне физиологии, молекулярной физиологии. Соответственно, как мы видели, именно в данной работе диссертант представил и протестировал такие инструменты. В частности, это внутриклеточный генетически кодируемый генератор перекиси водорода на основе оксидазы D-аминокислот. И, соответственно, способ его детекции так же с помощью генетически кодируемого сенсора. Здесь уже упоминалась структура работы, поэтому я подробно останавливаться на ней не буду. Это все у меня в отзыве официальном есть. Скажу, она стандартная, в принципе, все из обзора, из методов понятно. Хотя у меня есть ряд вопросов и замечаний, в частности к описанию, способам описания, в том числе материалов и методов, я о них скажу дальше.



Что касается результатов, также я должен отметить ключевые, на мой взгляд, результаты. А именно то, что были протестированы самые разные субстраты, самые разные D-аминокислоты. Было показано преимущество и недостатки разных аминокислот для этой цели, был выявлен наиболее оптимальный, и далее он использовался. Ключевым результатом является создание этого сенсора, генератора на основе изоформы оксидазы D-аминокислот. И показано, ключевое то, что мы видели в докладе. Доклад мне очень понравился, я из него даже некоторые моменты, которые мне были не очень понятны из диссертации лучше для себя прояснил. Была показана компартиментализация, соответственно, генерации активных форм кислорода, распространение диффузии, способ того, как клетка модулирует это распространение сигнала, как она его ограничивает или продолжает, чтобы он дальше распространялся. И, наконец, ключевые, на мой взгляд, результаты – это попытки уже применения для цитоплазматического генератора, для генерации в не модельных, а тех клетках, которые наиболее интересны – нейроны, гипоккомпальные нейроны – модельные клетки, нейроноподобные, РС-12. И самое интересное для меня как человека, тоже занимающегося с более физиологической точки зрения редокс процессами – это моделирование на животных. И попытка генерации в живых тканях, соответственно, анализ эффекта от генерации перекиси в живых тканях на формирование каких-то патологических паттернов, собственно, патологий сердца.

Безусловно, научная новизна не вызывает у меня сомнений. Эти результаты будут использованы и уже используются и в фундаментальной науке, и в прикладных областях. Самое широкое применение найдут и находят они. И мне это тоже было бы в будущем очень интересно попробовать, потому что современные способы, они обладают огромным количеством недостатков, хотя, тем не менее, они используются за неимением другого. Ну, вот, собственно, и группа Всеволода Вадимовича нам активно обеспечивает механизмы, чем мы могли бы заменить такие несовершенные химические генераторы и детекторы АФК. Также стандартная фраза про то, что достоверность и обоснованность результатов не вызывает сомнений, все на высоком методическом уровне. Мы сами видели, это молекулярно-биологические методы, флуоресцентная микроскопия, генетические моделирования, физиологические эксперименты. Это подтверждается тем, что результаты были опубликованы в трех статьях в очень высококлассных журналах международных, представлены на конференциях. В общем, уровень работы сомнений не вызывает. Но как оппонент я должен сказать замечания. Они у меня есть. Я призываю не рассматривать их как снижающие научную, фундаментальную, прикладную значимость, а, скорее, как повод для дискуссии и повод для какого-то улучшения возможного

дальнейших исследований и советов диссертанту. То есть, это и вопросы и, может быть, некие дискуссионные такие замечания.

Во-первых, я очень не люблю придирается к орфографическим, оформительским ошибкам, не люблю, когда это делают другие. Но здесь я вынужден, тем не менее, об этом сказать. Достаточно тяжело было в некоторых местах читать работу, потому что создается ощущение, что... Я понимаю, что диссертант прежде всего смотрел на научную компоненту, но как-то оформительская, она просто иногда не позволяла даже полностью вникнуть в научную суть, потому что несогласованность предложений, помимо опечаток и прочего, такая небрежность, она все-таки есть. И жаргонизмы, типа «крысы, заколотые вирусными частицами», они, конечно, режут глаз в научном труде. И я призываю все-таки быть более внимательным к этому. Также я говорю, что есть некоторые претензии к тому, что воспринимался материал сложно. Например, на рисунке 11, в автореферате это рисунок 3, приведено несколько кривых, которые говорят о некоем процессе. Расшифровки этих кривых нет, и мне пришлось очень долго вникать, что же это за кривые, почему их несколько, почему на одном рисунке их четыре или шесть, а на другом – две. Как выяснилось, это отдельные клетки. То есть, на самом деле, это статистика по клеткам, это очень важно. Но приведено это не было, и это затрудняет понимание и наслаждение научной составляющей текста.

Далее, конфокальный микроскоп, я, как бы, хотел бы его упомянуть как один из ключевых методов, но он упоминается в материалах и методах, не упоминается в результатах. Я так для себя и не понял, все-таки эти эксперименты делались на конфокальном или на обычном флуоресцентном микроскопе. Может быть, диссертант прояснит сейчас.

Также в экспериментах на культуре РС-12, там те, которые были сделаны, автор постулирует в диссертации, что с помощью модулирования редокс статуса, изменение с помощью этого генератора, мы можем влиять на дифференцировку клеток. Но вообще эти данные не были приведены, то есть это остается спекуляцией, это надо отмечать, что пока это не доказанная, а только возможная перспектива такого влияния.

В качестве вопроса, я просто не понял, возможно, не до конца вник, использовался здесь, тоже это было в докладе, упоминалось достаточно четко, что использовался именно химерный белок, то есть слитый сенсор с генератором. В чем преимущества, недостатки, вообще, почему была выбрана именно такая конструкция, а не отдельные сенсор и генератор в работе не объяснено. Я жду, что Юлия Антоновна объяснит, потому что, я так понимаю, это были какие-то для этого причины. Но из диссертации я для себя этого не уяснил.

И, наконец, самое для меня ключевое, с одной стороны, самый интересный и важный результат, с другой стороны, именно он вызывает у меня некоторые замечания, это, вот, опыты физиологические по моделированию патологий сердца, когда генерировали эту перекись в сердце крысы. И, как утверждается, видели хорошие эффекты именно развития конкретного патологического состояния, а именно дилатационной кардиомиопатии. То есть, это, на самом деле, четкое определенное состояние. Как я увидел из доклада, собственно, что я сказал, здесь было достаточно четко это представлено. Вот, в диссертации, к сожалению, или я не заметил, или это было как-то нечетко выражено. То есть, в тексте это все упоминалось, но конкретных физиологических и, там, морфологических, не морфологических не было и в докладе доказательств того, что развивается вот такое состояние, не было. И тоже это требует уточнения, потому что это ключевой результат. То есть, мы воздействуем, генерируем в ткани сердца перекись, что мы в результате получаем. Это обратимое, необратимое состояние. Хотя я говорю, что в докладе это значительно более четко прозвучало, я для себя понял, что, да, действительно, это так и есть. Но в диссертации, к сожалению, как-то это было значительно менее четко и смазано. Как я уже сказал, эти замечания, скорее, относятся к тому, как мы могли бы улучшить и без того хорошую работу, их необходимо обсудить. Но они не несут какой-то критической нагрузки и не снижают ценности научной этой диссертации. Поэтому я обязан зачитать, наверное, это, как оно звучит полностью в моем заключении.

Диссертационная работа Богдановой Юлии Антоновны соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, с соответствующими постановлениями правительства, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология. Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо за отзыв. Юлия Антоновна, будете отвечать? Прошу.

**Богданова Ю.А., соискатель:**

Я соглашусь с тем, что опечатки есть. Особенно их много в методах. Рисунок 11, действительно, подписан крайне плохо. Я сожалею, что при всех попытках вычитать диссертационную работу, я это не исправила. Про конфокальную микроскопию. Конфокальная микроскопия использовалась для визуализации клеток РС-12, так как в тот момент я находилась в другой стране, и там был доступен конфокальный микроскоп для общего пользования. Про то, что длительное изменение редокс статуса РС-12 вызывает изменение в дифференцировке, это предположение также умозрительно. У нас уже есть

некоторые данные на тему того, что это действительно так происходит, но они не представлены в диссертации, я о них не говорю здесь. Так что, да, я соглашусь с этим замечанием тоже. Про фьюз, почему мы использовали фьюз. В данном случае, DAAO не является флуоресцентным белком. И для того, чтобы визуализировать его экспрессию, необходима некая флуоресцентная метка, в идеале. И так как у нас есть флуоресцентный биосенсор, мы создаем фьюз вместе с ферментом. И одновременно, как бы, экспрессируем НуРег и как метку присутствия DAAO, и как сенсор на его активность. Эксперименты *in vivo*, описание которых отсутствует в диссертационной работе. Дело в том, что в той части работы, которая касается как раз *in vivo* экспериментов, я делала ту часть, которая касается *in vitro*. С крысами я не работала. Велось активное обсуждение этой работы с нашими коллабораторами, однако я не делала это своими собственными руками. Поэтому на момент написания я решила, что я не имею права это вставлять. Однако сейчас думаю, что это было неправильным решением, и графики все-таки, конечно же, в диссертации требовались. Так что с этим замечанием я тоже соглашусь, что это большой недостаток работы. Вот. Все.

**Иванов В.Т., председатель:**

Все у вас? Спасибо. Заслушаем официального оппонента, Александр Владимирович Иванов, Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта.

**Иванов А.В., оппонент:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).*

Добрый день, коллеги, очень приятно здесь выступать. Я думаю, я уже смогу короче говорить.

Наша лаборатория занимается тоже редокс биологией, но в основном для вирусных инфекций, и эта область намного менее развита. То есть, в основном, в вирусологии воспринимают ситуацию, какой она была в редокс биологии лет 20 назад, то есть, как просто баланс между продукцией активных форм кислорода в клетке, неважно, где, и общей такой антиоксидантной системой. При этом мало кто фокусируется на том, где происходит продукция активных форм кислорода, и какие процессы запускаются в инфицированных клетках. Работы лаборатории отдела Всеволода Вадимовича очень четкие дают прекрасные нам инструменты для исследования. Просто направления и методы для дальнейших применений. Данная работа абсолютно прекрасна. Очень понравился подход по направленной продукции перекиси водорода в тех или иных компартментах, в ядре, в цитоплазме и в других. И по анализу градиентов, естественно. Особо хотел отметить равно использование конструктора, про который говорил Константин

Анатольевич, о фьюзе белка NuPer с кератином, который абсолютно дал красивые картинки и визуализировал эти самые градиенты.

В работе, соответственно, показано и найдено, что можно использовать две аминокислоты, D-аминокислоты, D-аланин и D-норвалин для продукции перекиси водорода. Что можно, что существует такой градиент. И, регулируя уровни аминокислот, можно менять уровни продукции перекиси водорода. Кроме того, действительно, авторы связали окислительный стресс и назвали его как причину патологии сердца, а не просто как побочное явление, потому что в нашей области абсолютно так же. Часто говорят, вот, окислительный стресс – это просто как некое сопутствующее явление, присутствующее при самых различных патологиях. Здесь четко показано, что это нет.

Работа достаточно хорошо написана. Я не знаю, я ее читал как-то достаточно легко. Единственное, англицизмов многовато, но это тоже нормально. Литобзор прекрасный, содержит три части. Все три части необходимы для понимания работы. Единственное, здесь у меня такие вопросы, скорее по введению, по самому началу литобзора, в котором не хватает немножко ссылок. Для меня не очень хватало информации о том, какие концентрации перекиси водорода являются физиологичными, какие концентрации возникают при тех или иных патологиях, и ссылки на соответствующие работы. Кроме того, при описании источников активных форм кислорода и перекиси в частности, можно было бы назвать различные катаболические и метаболические ферменты, внепероксисомные, из разных метаболических путей, а также систему цитохромов, которые часто дают значительный вклад в продукцию активных форм кислорода в печени. И, наконец, значительная часть перекиси водорода продуцируется в эндоплазматическом ретикулуме системой фолдинга белков, тоже можно было бы сказать.

К разделу «Материалы и методы» у меня замечаний нет вообще. По-моему, все методы изложены четко, они достаточны для воспроизведения работы. Изложение результатов достаточно четкое. Понятно, что есть графики с множеством кривых, тоже пришлось потратить определенное время на их расшифровку и соотнесение с данными. Но, тем не менее, это можно было сделать, просто потратив время.

Здесь, скорее, тоже есть несколько вопросов дискуссионных. Во-первых, когда автор генерирует перекись водорода при помощи небольшой концентрации D-аминокислоты, продукция происходит в ядре, и дальше отсутствует градиент, то есть отсутствует накопление перекиси водорода, повышение концентрации в цитоплазме, возникает вопрос, это работает только система нейтрализации перекиси водорода? Или есть просто эффект разбавления? Потому что, явно цитоплазма больше ядра. Поэтому здесь хотелось бы примерно хотя бы обсуждение этого вклада. Кроме того, опять же, автор говорит о

том, что концентрация в определенных экспериментах перекиси водорода составляла не более такого-то уровня. Хотелось бы либо ссылки к предыдущим работам, то есть, откуда берутся эти данные. Наконец, абсолютно хороший результат получен при помощи ингибиторов тиоредоксиновой системы. И здесь можно было бы развить эту работу, анализируя роль тех или иных ферментов защиты от активных форм кислорода, в частности пероксиредоксинов, то, что можно было сделать. Но, явно, это не было целью данной конкретной работы.

Так что, опять же, работа замечательная. По объему она полностью соответствует кандидатским диссертациям. Опять же, могу зачитать, что работа отвечает требованиям, установленным положением о присуждении ученых степеней, утвержденных постановлением правительства и предъявляемых к диссертациям на соискание научных степеней. И автор, Богданова Юлия Антоновна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология. Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо вам. Юлия Антоновна, ваша очередь.

**Богданова Ю.А., соискатель:**

Из замечаний. Про диффузию. Известно, что в клеточной среде, в отсутствие антиоксидантов расстояние диффузии пероксида, считается, что пероксид способен диффундировать на расстояние около полутора миллиметров, в случае если у нас антиоксидантной системы нет. Это расстояние, считается, что, когда концентрация пероксида водорода падает в 10 раз. Если мы посмотрим на наши клетки, то наши клетки примерно 15 микрометров в диаметре, что существенно меньше полутора. При этом мы видим, что сенсор вокруг ядра полностью окислен, а значит, соответствующая концентрации насыщения  $H_2O_2$ , это в районе 200 наномолярных. Значит, на расстоянии полутора миллиметров мы обнаруживаем концентрацию пероксида в районе 20 наномолярных, которые тоже входят в тот самый спектр чувствительности  $H_2O_2$ . А значит, если бы у нас происходил, как бы, если бы это была диффузия конкретно и разбавление, тогда мы бы видели это очень четко по нашим клеткам.

Также в отзыве был вопрос про продолжительную детекцию. Дело в том, что, как мы выяснили, вообще метаболический статус клетки очень сильно влияет на то, как именно она разбирается с активными формами кислорода. А ее метаболический статус очень сильно зависит от того, как именно клетки мы ведем, какой это пассаж, насколько давно эта была открыта среда. Если вот эту часть с тиоредоксиновой системой мы детектируем всегда четко и красиво, то при длительном имаджинге того, что происходит, мы

сталкиваемся с низкой воспроизводимостью результатов. Поэтому это можно делать, но это будет соответствовать результатам на данных хелях, которые, данная разморозка, на данной банке среды сделанная.

Еще у вас был очень интересный вопрос, на самом деле, про возможность использования ДААО для мэпинга D-аминокислот в тканях. Ее, действительно, можно использовать для того, чтобы D-аминокислоты в тканях обнаруживать. Кроме того, мы даже обсуждали такую работу, про детектирование, собственно, очагов формирования D-серина в нейронах. Для этой работы мы планировали зафиксировать НуPer на цитоскелете по всему объему клетки. И если серинрацемаза, а это фермент, который продуцирует D-серин, каким-то образом по нейрону локализован, если мы экспрессируем ДААО в нейроне, мы сможем на фиксированном НуPer обнаруживать и очаги формирования D-серина. И это очень интересная задача. И я надеюсь, что мы ей когда-нибудь займемся. Однако пока она не была сделана. Я ответила на ваши вопросы?

**Иванов В.Т., председатель:**

Это мы можем либо в общей дискуссии, либо при личной беседе. А сейчас наступило время этой самой общей дискуссии. Если остались какие-то невысказанные аргументы за или против данной работы, прошу их изложить в формате общей дискуссии. Кто хочет выступить? Прошу, Виктор Ионович.

**Цетлин В.И.:**

Я не могу удержаться и очень хочу поделиться позитивными впечатлениями. Во-первых, сам доклад, манера его, активно – все это очень хорошо, все это замечательно. Мне тоже понравилось выступление руководителя, нестандартно было сравнено, провели сравнение, кто первый подходит, говорит: «Вот здесь должна быть шахта», и кто приходит потом, и так далее.

Но я вышел не только для этого. Потому что, в принципе, мне эта работа симпатична вот почему, потому что у нас в институте очень давно уже начали заниматься всякими роскошными новыми методами флуоресценции, Лукьянов, все это шло-шло. Но какое-то время это еще к проблемам реальной нейробиологии, реальным процессам не было приближено. Вот эта работа показывает, как вот эти инструменты, как с помощью таких инструментов подходят к реальному исследованию процессов в нейронах, и так далее, и так далее. У меня появляется легкое чувство зависти. Хочется, чтобы мои более молодые сотрудники активизировали сотрудничество с этими людьми, которые, действительно, кладут современные физико-химические методы просто в нейрон, в биологию. Какие-то шаги мы предпринимали. Я рад, что, скажем, синтетический фрагмент GFP белка мы

приложили к своим различным токсинам и показали, что это работает. Я буду очень рад, если в нашем отделе, в других отделах нашего института усилится это тенденция, где сначала какие-то инвиторные исследования рецепторов, их активности, поиск лигандов, и так далее. То, что сегодня здесь звучало. Подошла эта аминокислота, не аминокислота, другая кислота. Вот, если наш опыт где-то пригодится, я буду очень рад.

Еще раз хочу сказать, что очень положительное впечатление об этой работе. Естественно, я буду голосовать за. Понятно, что мое выступление призывает всех членов совета сделать то же самое.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо, Виктор Ионович. Кто-нибудь хотел бы добавить к тому, что мы здесь услышали, аргументы за, против? Какие-то сопутствующие соображения? По-видимому, все ясно. Я не ошибаюсь? Не видно поднятых рук. По-видимому, нет. Тогда Юлия Антоновна, вам заключительное слово.

**Богданова Ю.А., соискатель:**

Я могу выразить благодарность, я так понимаю, в этой части своего выступления. Я очень благодарна своему научному руководителю, потому что без него этой работы бы не было. Вообще он классный очень. Я очень благодарна Наталье Мишиной, которая тоже очень помогла в проделанной работе. Я благодарна, на самом деле, всему коллективу, с которым я работала, с отделом редокс биологии. Особенно я благодарна Анастасии Сергеевой и Роману Раевскому, которые крайне меня поддерживали в последнее время. Я благодарна Елене Фетисовой, которая была моей большой поддержкой несколько лет, которые мы работали вместе. Я очень благодарна, что она здесь. Я благодарна Лесе Белимовой, Дарье Котлячковой, Кристине и Дмитрию Шарло, Марине Загудайловой и Михаилу Баранову. Они были моей опорой, особенно в последние полгода. Я очень благодарна моему психотерапевту. И я благодарна Екатерине Малитовской за ее танцы. Я благодарна Евгению Шевченко, который крайне простимулировал меня к тому, чтобы я защитилась. Также я благодарна Дмитрию Шаховцеву. Все.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. Мы имеем все основания приступить к процессу голосования. У меня подготовлен уже согласованный традиционный по размеру состав счетной комиссии. Я могу его огласить без имен, отчеств, без титулов. Теневицкий, Завриев и Олейников. Три человека прекрасно справляются с объемом работы при наших голосованиях. Есть ли какие-то отводы или самоотводы? Самоотводов не должно быть, комиссия уже



согласована. Отводы есть? Нет. Давайте для формы проголосуем за данный состав счетной комиссии. Кто за? Кто против? Счетная комиссия избрана.

*(Идёт тайное голосование)*

**Иванов В.Т., председатель:**

Счетная комиссия завершила свою работу. Готова нам доложить.

**Олейников В.А., учёный секретарь:**

Богданова Юлия Антоновна. Результаты голосования. Роздано бюллетеней – 21, оказалось в урне бюллетеней – 21, за – 21, против и недействительных нет.

*(Далее идет голосование по проекту заключения совета. Проект заключения совета принимается единогласно.)*

Председатель  
диссертационного совета

Учёный секретарь  
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

д.ф.-м.н. Олейников В.А.