

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), по диссертации
на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 02.03.2022 г. № 4

О присуждении **Богдановой Юлии Антоновне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Исследование редокс-зависимых процессов в живых системах с помощью хемогенетических инструментов» по специальности 1.5.3 Молекулярная биология принята к защите 22 декабря 2021 года (протокол заседания №17) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе ИБХ РАН, (адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; действует на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021).

Соискатель Богданова Юлия Антоновна, 28 июля 1992 года рождения, в 2015 году соискатель окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» по специальности «биохимия».

С 2015 по 2019 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярных технологий ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярных технологий отдела метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН.

Научный руководитель - доктор биологических наук Белоусов Всеволод Вадимович, профессор РАН, заведующий отделом метаболизма и редокс-биологии ИБХ РАН, директор ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства.

Официальные оппоненты:

Плотников Егор Юрьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий Отдела функциональной биохимии биополимеров НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова;

Иванов Александр Владимирович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук;

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России), Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном зам. генерального директора по научной работе, д.б.н., доцентом Лазаревым Василием Николаевичем, и утвержденном ВРИО генерального директора, д.б.н., член-корр. РАН Лагарьковой Марией Андреевной, указала, что диссертационная работа Богдановой Юлии Антоновны «Исследование редокс-зависимых процессов в живых системах с помощью хемогенетических инструментов» соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016г № 335; 02.08.2016г №748; от 29.05.2017 г №650; от 20.03.2021г №426), а сам диссертант, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Соискатель имеет 7 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 3 работы общим объемом 2 печ. л., они опубликованы в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы SCOPUS и Web of Science. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Богданова Ю.А. внесла основной и существенный вклад:

Bogdanova Y.A., Schultz C., Belousov V.V. Local Generation and Imaging of Hydrogen Peroxide in Living Cells. // Current Protocols in Chemical Biology, 2017 Jun 19;9(2):117-127

Steinhorn B., Sorrentino A., Badole S., **Bogdanova Y.**, Belousov V., Michel T. Chemogenetic generation of hydrogen peroxide in the heart induces severe cardiac dysfunction. Nature Communications, 2018 Oct 2;9(1):4044

Mishina N.M.*, **Bogdanova Y.A.***, Ermakova Y.G., Panova A.S., Kotova D.A., Bilan D., Steinhorn B., Arnér E.S., Michel T., Belousov V. Which antioxidant system shapes intracellular H₂O₂ gradients? Antioxid Redox Signal. 2019 Sep 20;31(9):664-670 **авторы внесли равный вклад в работу.*

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Плотникова Егора Юрьевича. Отзыв положительный, содержит замечания:

1. Большое количество оформительских и грамматических ошибок, несогласованных фраз затрудняют понимание текста и создают ощущение некоторой спешки или

- небрежности диссертанта при подготовке диссертации. Также работа изобилует жаргонизмами, например, фраза «крыс, заколотых вирусными частицами».
2. Также из-за оформительских огрехов некоторые рисунки очень сложно воспринимать и интерпретировать данные на них. Так не указано, что разные кривые на рис. 11 (аналогичный рис. 3 в автореферате) относятся к разным клеткам в культуре, поскольку расшифровки цвета кривых нет. При этом в части рисунков таких кривых две, а в части 4-6.
 3. Конфокальный микроскоп упоминается в методах и более нигде, не понятно использовалась ли конфокальная микроскопия для имаджинга или только флуоресцентная.
 4. В экспериментах на культуре РС-12 автор утверждает, что с помощью модулирования редокс-статуса за счет DAAO можно влиять на дифференцировку клеток, в данный момент это утверждение экспериментально не обосновано.
 5. В ряде опытов использовался химерный белок, представляющий из себя слитые сенсор (например, HyPer7) и генератор (DAAO) перекиси водорода. В чем преимущества такой конструкции, и в целом для чего она нужна в экспериментах, автором не объясняется.
 6. В исследованиях *in vivo* на крысах автор описывает развитие дилатационной кардиомиопатии и появление маркеров сердечной недостаточности, однако эти результаты не приведены в виде рисунков и каких-то экспериментальных данных.

Отзыв официального оппонента к.х.н. Иванова Александра Владимировича.

Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Работа изобилует ненужными англицизмами, которые, однако, не мешают ее восприятию.
2. При обсуждении существования градиента концентрацией пероксида при генерировании их в ядре и измерении в цитоплазме хотелось бы понимать оценку возможного вклада разбавления перекиси. Кроме того, на странице 83 можно было бы обсудить, какие концентрации пероксида являются физиологичными в разных компартментах клетки.
3. Не проводил ли диссертант сравнение уровней перекиси в динамике в течение продолжительного времени. Он мог бы дать оценку изменений статуса антиоксидантных систем клетки?
4. Не пробовали ли в работе или за ее рамками использовать подход по гиперэкспрессии DAAO в нейральных клетках для измерения концентраций D-аминокислот в клетках и тканях?

Отзыв Ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующее замечание:

Есть некоторые терминологические неточности. Так автор определяет активные формы кислорода (АФК), как «химически активные соединения, содержащие кислород» (см. стр. 9 в диссертации). Это слишком упрощенное и устаревшее определение. Почему? Всем известна другая группа реакционных соединений, а именно, активные формы азота (АФА), например, NO, NO₂, NO₂⁻, ·NO₂, N₂O₃ и др. Как видно, все они содержат кислород, однако, их выделяют в отдельную группу АФА. То же самое можно сказать и об активных формах галогенов (АФГ): NOCl, NOBr и др. Они тоже 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 к АФК относить те кислородосодержащие соединения, реакционность которых определяется именно атомом кислорода. В связи с этим следует заметить, что отнесение NO, а также гипохлорита и гипобромита к АФК (как это сделано в диссертации) неверно.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: редокс-биология, медицина, генетически-кодируемые инструменты, молекулярная биология различных типов клеток, флуоресцентная микроскопия, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих научных международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы и высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований была обнаружена возможность использовать D-норвалин в качестве субстрата хемогенетического генератора пероксида водорода DAAO в живых системах. Было показано, что с помощью D-норвалина в данной генетически кодируемой системе можно создавать широкий спектр концентраций пероксида водорода в цитозоле клеток, позволяющий моделировать как сигнальные, так и патологические процессы. Также было показано, что использование D-норвалина позволяет генерировать H₂O₂ с помощью DAAO в матриксе митохондрий, а значит, была создана система, впервые позволяющая продуцировать H₂O₂ в митохондриях без вмешательства в функционирование ЭТЦ. Впервые DAAO был использован для изменения редокс-статуса клеток РС-12 на короткие и длительные промежутки времени. Также впервые была предпринята попытка модулировать редокс-статус нейронов при помощи хемогенетического генератора пероксида, но экспрессия DAAO привела к формированию пероксида водорода без добавления внешних D-аминокислот. Впервые была визуализирована ограниченность

диффузии пероксида водорода в цитозоле клеток Hela Kyoto, ранее известная только по косвенным данным. Была выявлена ключевая роль тиоредоксиновой ветви антиоксидантной защиты в этом процессе. Кроме того, продемонстрировано, что экспрессия DAAO в кардиомиоцитах *in vitro* и *in vivo* в присутствии D-аминокислот приводит к развитию окислительного стресса и патологических состояний сердца. Ранее исследование роли окислительного стресса в развитии патологий отдельных тканей млекопитающих было невозможно вследствие отсутствия подходящих инструментов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что проведенные диссертантом исследования и полученные результаты, о которых сказано выше, существенно расширяют наше понимание редокс-зависимых процессов клеток разных типов. Также получено значительное количество новых данных об особенностях биологии D-изомеров аминокислот.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что существенным образом расширена область применения хемогенетического генератора пероксида водорода (DAAO), полученные в ходе работы результаты можно применить для исследований особенностей биологии редокс-процессов различных типов клеток в патологии и при эустрессе. В том числе, предложен метод по поиску новых ингибиторов тиоредоксиновой ветви антиоксидантной защиты – веществ, крайне важных на данный момент для терапии онкозаболеваний. Та же система может быть использована для изучения особенностей формирования градиентов АФК в различных типах клеток, их участии в патологии и физиологических процессах. Кроме того, важнейшим результатом работы является демонстрация принципиальной возможности использования хемогенетического генератора пероксида водорода на крысах *in vivo* для создания окислительного стресса в отдельном органе животного, при этом животные требовали минимального количества хирургических манипуляций. Разработанная методика может позволить изучить вклад окислительного стресса в развитие патологий различных органов, а затем, возможно, и разработать новые типы терапий, направленные на облегчение симптомов данных патологий.

Оценка достоверности результатов исследования сомнений не вызывает и выявила, что использование описанных методик обосновано, работа выполнена на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования. Данные получены в независимых экспериментах в необходимом объеме. Примененные методы статистического анализа адекватны полученным данным. Также проведено сравнение авторских данных с ранее опубликованными по тематике данными, выявлены сходства и различия, они обсуждены в тексте, даны необходимые объяснения и обоснования.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, литературном поиске, сборе данных, разработке новых экспериментальных методик и методик анализа данных, интерпретации полученных результатов, участии в апробации результатов исследования на российских и международных конференциях, подготовке публикаций. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии при содействии к.б.н. Мишиной Н.М., старшего научного сотрудника лаборатории молекулярных технологий ИБХ РАН, за исключением экспериментов по исследованию окислительного стресса *in vivo*, выполненных коллективом лаборатории Томаса Мичела (Department of Medicine, Division of Cardiology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School).

В ходе защиты диссертации был задан уточняющий вопрос:

Почему в экспериментах по созданию градиента пероксида водорода в клетках Hela Kyoto не использовали NuPer во фьюзе с белком цитоскелета?

Соискатель Богданова Ю.А. дала обоснованный ответ на заданный вопрос:

В параллельных экспериментах был создан фьюз DAAO с белком цитоскелета кератином, с его использованием также был продемонстрирован градиент пероксида в цитозоле клеток Hela Kyoto.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Богдановой Ю.А. написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят важный вклад в развитие исследований в области молекулярной биологии. Таким образом, диссертационная работа Богдановой Юлии Антоновны «Исследование редокс-зависимых процессов в живых системах с помощью хемогенетических инструментов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. №748; от 29.05.2017 г. №650; от 20.03.2021 г. №426).

На заседании 2 марта 2022 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по расширению применения хемогенетического генератора пероксида водорода, имеющей важное значение для исследований в областях молекулярной биологии и медицины, присудить Богдановой Юлии Антоновне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 –

Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН

Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Олейников Владимир Александрович

3 марта 2022 г.

