

УТВЕРЖДАЮ  
ВРИО генерального директора  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Федеральный научно-клинический центр  
физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства»  
член-корр. РАН, д.б.н., профессор  
Лагарькова Мария Андреевна



«10» февраля 2022 г.

### Отзыв

Ведущей организации на диссертацию **Богдановой Юлии Антоновны** по теме **«Исследование редокс-зависимых процессов в живых системах с помощью хемогенетических инструментов»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

### Актуальность темы выполненной работы

Редокс-биология завоевывает внимание исследователей самых разных биологических и медицинских специальностей. Изучаемые в рамках редокс-биологии процессы регулируют протекание широкого круга сигнальных каскадов, ферментативных реакций, определяют саму судьбу клетки. Дизрегуляция процессов синтеза и разрушения активных форм кислорода приводят к развитию патологических состояний. В этих условиях ощущается острая нехватка инструментов, позволяющих изучать функции отдельных активных форм кислорода в норме и патологии. Одному из таких инструментов и посвящена данная работа. Речь идет о ферментной системе на основе оксидазы D-аминокислот дрожжей (DAAO). DAAO позволяет генерировать пероксид водорода в различных компартментах клеток при добавлении к ее последовательности сигналов внутриклеточной локализации, может быть экспрессирована под тканеспецифичными промоторами и быть использована в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*.

### Общая характеристика и структура диссертационной работы

Диссертационная работа Богдановой Ю.А. изложена на 151 странице, состоит из списка сокращений, введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов с их обсуждением и заключения, включающего сделанные по работе выводы. Работа хорошо проиллюстрирована и также включает список литературы, состоящий из 346 литературных источников.

Во Введении приведены разделы, описывающие актуальность описываемого исследования, степень разработанности темы, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, также здесь приведены цель и задачи исследования, список опубликованных по результатам исследования статей и тезисов докладов, представленных на конференциях.

Глава 1 – Обзор литературы – содержит описание особенностей биологии активных форм кислорода. Приведена подробная характеристика пероксида водорода как сигнальной молекулы, описаны особенности редокс-сигналинга с участием активных форм кислорода. Следующая глава содержит детальное описание различных генераторов активных форм кислорода, за ней следует глава о существующих способах детекции пероксида водорода. Обзор написан хорошим языком и включает информацию, необходимую для дальнейшего понимания результатов проведенных исследований.

В главе 2 – Материалы и методы – подробно описаны все использованные в работе методы от молекулярного клонирования до анализа полученных в процессе микроскопирования изображений. Следует отметить современный уровень и большое разнообразие использованных в работе методов исследования: цитологических, молекулярно-биологических, биохимических, микробиологических, микроскопических и других.

В главе 3 – Результаты и обсуждение – описаны полученные в ходе решения поставленных задач экспериментальные данные, приведен их анализ, обсуждаются возможные направления дальнейших изысканий в исследуемой области.

Из полученных данных следует отметить скрининг различных субстратов ДААО, в результате которого был предложен D-норвалин для генерации пероксида водорода в живых системах, в частности – клетками Hela Kyoto. Автору удалось создать генетические конструкции для направленной генерации пероксида водорода в различных органеллах клетки: в митохондриях, в ядре, а также в ее цитоплазме. Продемонстрирована возможность использования хемогенетического генератора пероксида водорода в кардиомиоцитах с целью индукции окислительного стресса как на уровне клеточной культуры, так и на уровне сердца экспериментального животного.

Полученные результаты расширяют наше понимание механизмов редокс-процессов в клетках разных типов, участия пероксида водорода в развитии патологий сердца, позволяют оценить роль различных окислителей и антиоксидантных систем в возникновении и предотвращении окислительного стресса. Результаты работы могут послужить основой для создания тест-систем, направленных на скрининг антиоксидантов и других веществ – потенциальных регуляторов редокс процессов в живой клетке.

Последняя глава работы – Заключение – описывает суть полученных результатов и содержит выводы по проделанной работе.

По результатам, представленным в диссертационной работе, опубликованы 3 статьи в международных рецензируемых журналах, представлены тезисы докладов

на трех российских и международных конференциях, часть результатов стала основой для учебной задачи, проведенной в рамках Advanced Fluorescence Imaging Techniques в Европейской Молекулярно-Биологической Лаборатории (EMBL, Heidelberg) в 2016 и 2017 годах.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

В научном отношении диссертационная работа Богдановой Ю.А. отличается высокой степенью новизны и оригинальности. Автору впервые удалось показать, что D-норвалин может быть использован в качестве перспективного субстрата для генерации пероксида водорода при помощи ДААО в живых клетках. Использование этой системы позволило индуцировать образование пероксида водорода в клетке в концентрациях, необходимых как для внутриклеточной сигнализации, так и для инициирования окислительного стресса. Автору удалось существенно расширить область применения хемогенетических генераторов пероксида водорода, что дало возможность моделировать как процессы внутриклеточной сигнализации, так и развитие ранних стадий окислительного стресса на клеточном уровне.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

Примененные автором современные молекулярно-биологические и цитологические методы адекватны поставленным задачам. Работа выполнена на большом объеме экспериментального материала с использованием таких методов как мультипараметрическая микроскопия, проточная цитометрия, биохимические анализы, выделение и поддержание первичных нейрональных культур. Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Все это позволяет сделать вывод о высокой репрезентативности результатов и выводов диссертации. Представленные в автореферате и публикациях результаты полностью отражают проведенные диссертанткой исследования.

По 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» (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,  $\bullet\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\bullet\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$  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):  $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$  и др. Они тоже содержат кислород. Отличие классических АФК ( $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{RO}\bullet$ ,  $\text{ROO}\bullet$ ) 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 правильно к АФК относить те кислородсодержащие 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) является неверным.

Указанное замечание не носит принципиального характера, не влияет на выводы диссертации и не снижает высокой научной ценности представленной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Богдановой Юлии Антоновны по актуальности темы, объему выполненной работы, новизне полученных данных, важности разработанных теоретических и практических положений, надежности полученных результатов и обоснованности выводов полностью 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, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу работа Богдановой Юлии Антоновны «Исследование редокс-зависимых процессов в живых системах с помощью хемогенетических инструментов» рассмотрен, обсужден и одобрен единогласно на заседании отдела клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России 08 февраля 2022 года, протокол № 2.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России), 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская дом 1а, Телефон: +7 (499) 246-4409, E-mail: [info@rcpcm.org](mailto:info@rcpcm.org)  
<http://rcpcm.org>

Отзыв составлен 07 февраля 2022 года заместителем генерального директора по научной работе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, д.б.н. Лазаревым Василием Николаевичем.

Рабочий тел., факс: +7 (499) 245-04-71;  
e-mail: [lazar0@mail.ru](mailto:lazar0@mail.ru)

В.Н. Лазарев

Подпись Лазарева Василия Николаевича заверяю

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,  
кандидат биологических наук



Т.Н. Грибова