

Отзыв

официального оппонента 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

Роль активных форм кислорода (АФК) как в развитии патологических процессов, так и в передаче сигналов в физиологических условиях активно изучается уже не первое десятилетие. Несмотря на значительный прогресс в этой области белых пятен в нашем понимании всей совокупности редокс-сигнализации все еще остается достаточно много. Не последнюю роль в этом играет недостаток как адекватных способов детекции различных АФК, так и нехватка инструментов, позволяющих осуществлять направленную генерацию АФК. В клеточной биологии для решения этой задачи нужны малоинвазивные и нетоксичные для клетки инструменты, причем желательно обладающие нацеленностью на конкретные компартменты клеток, типы клеток, а в идеале и органы. В данной работе диссертант представил и протестировал перспективный инструмент такого воздействия – внутриклеточный генетически кодируемый генератор перекиси водорода на основе оксидазы D-аминокислот.

Общая характеристика и структура диссертационной работы

Работа построена по традиционной схеме, содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результатов, их обсуждения, и заключения, включающего выводы. Текст диссертации изложен на 151 странице, работа иллюстрирована девятнадцатью рисунками и одной таблицей. Приведено 346 ссылок на англоязычные литературные источники.

Введение содержит необходимые описания актуальности темы исследования и степени ее разработанности, цели и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования. Здесь же приведены информация об апробации работы и список опубликованных по результатам исследования статей.

Глава, содержащая **Обзор литературы**, хорошо написана и проиллюстрирована. Описаны основные аспекты биологии активных форм кислорода (АФК) и пероксида водорода в частности, внутриклеточные системы, способные к генерации АФК, антиоксидантные системы и белки-транспортеры. Далее автор описывает основные принципы, позволяющие пероксиду водорода выполнять функции передачи сигнала в клетке или между клетками. Последние две главы посвящены существующим подходам к генерации и детекции АФК, в них описаны как классические давно используемые химические сенсоры различных активных форм кислорода, в том числе флуоресцентные зонды, так и генетически-

кодируемые сенсоры на основе различных белков. Обзор составляет значительную часть текста диссертации и в целом содержит всю информацию, необходимую для понимания проблемы.

Материалы и методы описаны достаточно подробно, последовательно, содержат описание основных молекулярно-биологических процедур, работы с различными эукариотическими клетками (первичными и иммортализованными), эксперименты по микроскопии и методам обработки полученных изображений. К этому разделу есть некоторые замечания, которые приведены ниже.

Результаты и обсуждение содержат описание полученных экспериментальных результатов, их интерпретацию, также намечены перспективы дальнейшей работы. Богдановой были протестированы различные субстраты оксидазы D-аминокислот, выбран наиболее эффективный и нетоксичный из них, доказана возможность использования D-норвалина для генерации пероксида водорода в клетках Hela Kyoto.

На основе изоформы DAAO из *Rhodotorula gracilis* были созданы генетические конструкторы для направленной генерации пероксида водорода в ядре, цитозоле и митохондриях. С помощью этих конструкторов, а также генетически кодируемых сенсоров семейства НуPer была показана компартиментализация и распространение продукции пероксида водорода, в частности диффузия из ядра в цитозоль и наоборот. В регуляции этих процессов распространения редокс-сигнала показана ключевая роль тиреоредоксиновой антиоксидантной системы цитоплазмы и митохондрий.

Была сделана попытка использования цитоплазматического генератора перекиси в гиппокампальных нейронах, показавшая ограничения и проблемы использования данного конструктора, хотя для нейрон-подобных клеток PC-12 данный подход был эффективен. Также конструкторы на основе DAAO были использованы создания хомогенетического генератора перекиси в кардиомиоцитах и показана их эффективность как *in vivo*, так и *in vitro*.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

Полученные Богдановой Ю.А. результаты, несомненно, могут быть использованы как в фундаментальной науке, так и в прикладных областях. Полученные генетически-кодируемые генераторы перекиси и способы их детекции, несомненно, найдут самое широкое применение в клеточной биологии, исследованиях редокс-сигнализации и окислительного стресса при различных патологиях, а возможность внедрения таких конструкторов в ткани животных открывает большие перспективы и для физиологических исследований.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Исследование проведено на высоком методическом уровне, в нем использованы современные молекулярно-биологические, биохимические, цитологические методы и подходы к микрокопированию. Достоверность приведенных данных подтверждена статистически.

Материалы диссертационной работы Богдановой Ю.А. опубликованы в трех статьях в ведущих международных журналах и были представлены на трех российских и международных конференциях. Также материалы данной диссертации послужили основой для создания учебной задачи участников Advanced Fluorescence Imaging Techniques в Европейской Молекулярно-Биологической Лаборатории (EMBL, Heidelberg) в 2016 и 2017 году.

Несмотря на большое фундаментальное значение полученных результатов, их несомненную актуальность и практическую значимость для молекулярной и клеточной биологии у меня имеется ряд замечаний и вопросов:

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, фразы *«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 PC-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.

Отмечу, что данные замечания не носят принципиального характера и не умаляют ценности данной диссертационной работы

Заключение

Диссертационная работа Богдановой Юлии Антоновны 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.

**Заведующий лабораторией
структуры и функции митохондрий
НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова,
д.б.н. Плотников Егор Юрьевич**



119992 Москва, ГСП-1,
Ленинские горы, д.1, стр.73
Тел.: 8-916-554-23-39
E-mail: plotnikov@belozersky.msu.ru

Подпись д.б.н. Плотникова Е.Ю.
«Удостоверяю»
Зам.директора НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского



Д.А.Матвеев

«14» февраля 2022г.

