ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертационную работу Иджиловой Ольги Степановны
«Разработка оптогенетических инструментов на основе опсинов первого и второго типа»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных (биологические науки).

Актуальность темы

Диссертация посвящена разработке и экспериментальной проверке новых оптогенетических инструментов на основе микробных опсинов (опсин водоросли *Platymonas subcordiformis*) и опсинов позвоночных (коротковолновый колбочковый опсин), а также исследованию принципов их субклеточного таргетирования в нейронах и применимости для протезирования дегенеративной сетчатки. Актуальность работы определяется тем, что оптогенетика в последние два десятилетия стала одним из ключевых методов системной и клеточной нейрофизиологии, позволяя с высокой пространственно-временной селективностью управлять активностью нейронных популяций и регистрировать их ответы.

Существующие инструменты (в первую очередь канальный родопсин-2 и его производные) хотя и широко применяются, но не всегда обеспечивают оптимальное сочетание спектральных, кинетических и таргетирующих характеристик для задач полностью оптических экспериментов и клинического протезирования сетчатки, где особенно важны спектральное разделение каналов, стабильность фототоков и контролируемое субклеточное распределение. Кроме того, наследственные дегенеративные заболевания сетчатки, такие как пигментный ретинит, остаются нерешённой медико-социальной проблемой, для которой оптогенетическое протезирование рассматривается как один из немногих реально перспективных подходов. На этом фоне выбор объекта исследования и постановка цели диссертации представляются своевременными и научно обоснованными. Поэтому работа Иджиловой О.С., целью которой является анализ особенностей функционирования опсинов при их эктопической экспрессии в нервных клетках, в частности для целей оптогенетического протезирования сетчатки, представляется несомненно обоснованной, актуальной и важной.

Общая структура диссертации

Диссертационная работа представляет собой тщательно оформленный труд, построенный, в общем, традиционным образом и включает введение, четыре главы основного текста, заключение, выводы, списки сокращений, литературы, публикаций и иллюстраций. Список цитируемой литературы, включающий около 200 источников, впечатляет и указывает на эрудированность и глубокие знания автора в исследуемой области.

Во введении чётко сформулированы актуальность, цель и задачи исследования, приведены положения, выносимые на защиту, обозначены научная новизна и практическая значимость, а также степень достоверности и апробации работы.

Глава 1 представляет собой обстоятельный обзор литературы по оптогенетике, включающий разделы, посвящённые значению метода, микробным и животным опсинам, стратегиям доставки и генетического таргетирования, флуоресцентным сенсорам и полностью оптическим подходам, а также современному состоянию вопроса по оптогенетическому протезированию сетчатки. Обзор хорошо структурирован и охватывает как классические, так и новейшие работы.

В главе 2 подробно описаны материалы и методы: используемые линии мышей (ICR, rd1_KO и т.д.), конструкции вирусных и плазмидных векторов, методики приготовления культур и срезов, протоколы вирусной трансдукции и *in utero* электропорации, параметры электрофизиологической регистрации, оптического картирования и поведенческого тестирования. Отдельный подраздел посвящён статистическому анализу.

Глава 3 содержит результаты, логично разделённые на четыре блока: свойства опсина *P. subcordiformis*, пилотный полностью оптический эксперимент, исследование мотива Kv2.1 и оптогенетическое протезирование сетчатки. В каждом подразделе представлены как качественные (иллюстративные), так и количественные данные (графики, диаграммы, статистика).

В главе 4 обсуждаются полученные результаты в контексте современных представлений, отдельно для опсина *P. subcordiformis*, мотива Kv2.1 и протезирования коротковолновым опсином колбочек, с сопоставлением с данными других групп и анализом возможных механизмов наблюдаемых эффектов.

Заключение и выводы подводят итоги работы и в сжатом виде формулируют основные достигнутые результаты. Сформулированные выводы соотносятся с поставленными задачами, являются обоснованными и полностью соответствуют полученным результатам.

Научная новизна и достоверность

Следует отметить новизну и оригинальность исследования. В работе представлены результаты, обладающие несомненной научной новизной и подтверждённые совокупностью электрофизиологических, морфологических и поведенческих данных.

Во-первых, получены новые данные по канальному родопсину *Platymonas subcordiformis* в нейронах. Автор впервые характеризует опсин из *Platymonas subcordiformis* при его экспрессии в первичных культурах нейрогов гиппокампа в прямом сравнении с классическим канальным родопсином-2. Показано, что при стимуляции синим светом (470 нм) амплитуды стационарных фототоков опсина *P. subcordiformis* сопоставимы с таковыми для канального родопсина-2, а предельные частоты следования потенциалов действия достигают 40 Гц. Впервые детально продемонстрировано, что чувствительность опсина *P. subcordiformis* к зелёному свету (530 нм) существенно ниже, чем у канального родопсина-2, что критично для минимизации нецелевого возбуждения опсинов при использовании красных кальциевых индикаторов.

Во-вторых, в диссертации описана бицистронная генетическая конструкция, обеспечивающая коэкспрессию коротковолнового опсина и красного генетически кодируемого кальциевого индикатора в одних и тех же нейронах. Автор демонстрирует возможность стимуляции нейронов светом на длине волны 470 нм, которая возбуждает опсин, с одновременной регистрацией кальциевых ответов по флуоресценции красного кальциевого сенсора RGECO. Эти результаты фактически подтверждают принципиальную реализуемость полностью оптического физиологического эксперимента на основе выбранной пары молекулярных инструментов.

В-третьих, впервые на модели нокаутных слепых мышей выполнена неселективная AAV-опосредованная экспрессия коротковолнового опсина колбочек в дегенеративной сетчатке, с последующей оценкой зрительной функции в трапециевидном водном лабиринте Морриса. Показано, что опытная группа протезированных мышей достигла статистически значимо более высокого процента успешных попыток при поиске скрытой платформы по сравнению с контрольной группой, в сетчатке которой был экспрессирован GFP. Эти результаты являются свидетельством частичного восстановления свето-зависимой навигации.

Теоретическая и практическая значимость

Важно отметить многоплановую теоретическую значимость диссертации.

Во-первых, полученные данные углубляют представления о том, как экзогенные опсины с отличающимися спектральными и кинетическими характеристиками ведут себя в реальных нейронах, а не только в модельных клеточных линиях. Показано, что опсин *P. subcordiformis* в условиях нейрональной цитоплазматической мембраны обеспечивает высокую временную точность, устойчивость фототоков и пониженную чувствительность к зелёному свету, что важно для построения многоканальных оптогенетических систем и полностью оптических протоколов.

Во-вторых, наблюдаемый автором эффект дозозависимого нарушения таргетирования химерного белка с мотивом калиевого канала Kv2.1 вносит вклад в понимание ограничений и насыщаемости внутриклеточных транспортных систем нейронов. Работа демонстрирует, что таргетирующий мотив следует рассматривать не как «идеальный адресный ярлык», а как элемент, чувствительный к уровню экспрессии и, вероятно, к состоянию систем внутриклеточного транспорта.

В-третьих, использование G-белок-связанного опсина позвоночных для протезирования сетчатки дополняет существующую парадигму применения микробных опсинов, показывая принципиальную возможность восстановления зрительных функций за счёт активации эндогенных сигнальных каскадов и, потенциально, более физиологичного усиления светового сигнала.

Также важно подчеркнуть практическую значимость работы Иджиловой О.С.

Результаты по опсину *P. subcordiformis* дают исследовательскому сообществу хорошо охарактеризованный коротковолновый катионный канал, пригодный для комбинирования с красными кальциевыми и потенциал-чувствительными индикаторами, что может быть учтено при планировании полностью оптических экспериментов.

Данные о дозозависимом нарушении таргетирования при использовании мотива Kv2.1 позволяют сформулировать практические рекомендации по выбору концентраций плазмид при *in utero* электропорации и при использовании аденассоциированных вирусных векторов, а также предупреждают о рисках оверэкспрессии и потери соматоспецифичности экспрессии.

Показанное улучшение поведенческих параметров, обусловленных зрительным восприятием, у слепых мышей rd1_KO после экспрессии человеческого коротковолнового опсина колбочек демонстрирует жизнеспособность подхода оптогенетического протезирования на основе опсинов второго типа, что может быть использовано при разработке новых стратегий генной терапии наследственных дистрофий сетчатки, в том числе в комбинации с селективными промоторами и более таргетированными схемами доставки.

Основные полученные результаты диссертационной работы были опубликованы в ряде научных журналов, которые входят в базы данных Scopus и Web of Science. Стоит отметить, что апробация результатов работы была представлена на различных конференциях, что позволило научному сообществу в полной мере ознакомиться с исследованиями автора.

Работа апробирована на профильных конференциях и сопровождена публикациями в журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в Scopus и Web of Science, что дополнительно подтверждает её достоверность.

Недостатки, замечания и вопросы к автору

Несмотря на прекрасное впечатление, которое производит работа Иджиловой О.С., имеется несколько замечаний и вопросов.

Научно-методические замечания

1. Ограниченность количественной проработки полностью оптического эксперимента. Пилотный полностью оптический эксперимент описан в основном качественно: показана принципиальная схема эксперимента и примеры флуоресцентных ответов. Однако отсутствуют количественные показатели чувствительности и динамики системы (амплитуда ΔF/F, соотношение сигнал/шум, латентность и длительность ответов, доля клеток с надёжной регистрацией), а также сравнение с параллельной электрофизиологической регистрацией. Для методологически ориентированной работы эти параметры были бы крайне желательны.

2. Неполная проработка интерпретации механизмов таргетирования с помощью мотива Kv2.1. Хотя автор убедительно демонстрирует дозозависимое нарушение соматического таргетирования при использовании мотива калиевого канала Kv2.1, обсуждение возможных

механизмов сводится к общему тезису о «насыщении таргетирующего механизма». Не представлены данные о локализации эндогенного Kv2.1 на фоне оверэкспрессии. В будущем было бы полезно дополнить исследование иммуногистохимией уровня экспрессии эндогенного Kv2.1 и тестированием других уровней экспрессии конструкции (ниже 0,35 мкг/мкл и между 0,35 и 1 мкг/мкл).

3. Кроме того, совершенно не обсуждается возможность того, что наблюдаемое диффузное распределение может быть связано не только с насыщением таргетирующего механизма, но и с токсичностью высоких уровней экспрессии, нарушением фолдинга белка, образованием агрегатов или другими побочными эффектами оверэкспрессии. Хотелось бы услышать ваши соображения на этот счет.

4. Не полностью раскрыт вопрос о безопасной длительности экспрессии. В блоке по сетчатке автор ограничивается описанием морфологических изменений и поведенческого эффекта в относительно ограниченные сроки после AAV-трансдукции. Можете ли вы привести собственные или литературные данные о безопасности долговременной экспрессии колбочковых опсинов в тех типах клеток сетчатки, в которых они не экспрессируются естественным образом, например в ганглиозных клетках?

5. Анализ спектральных характеристик опсина *P. subcordiformis* в нейронах остаётся фрагментарным. Хотя продемонстрированы ключевые точки спектра (470, 530, 550 нм) и показано важное снижение чувствительности к зелёному свету, в работе не приведён полный спектр возбуждения опсина, измеренный именно в нейронах, а не по литературным данным для HEK293. За счет этого несколько снижается применимость результатов при использовании различных светочувствительных индикаторов и многоцветных протоколов.

Содержательные и редакционные замечания

6. Неоднородная степень детализации в разделе «Обсуждение». Подраздел 4.1, посвящённый опсину *P. subcordiformis*, заметно более подробен, чем разделы 4.2 и 4.3, касающиеся мотива Kv2.1 и оптогенетического протезирования соответственно. В частности, обсуждение клинических перспектив протезирования колбочковым опсином и сравнительный анализ преимуществ/недостатков опсинов первого и второго типа могли бы быть расширены.

7. Не полностью устранены формальные неточности. В тексте встречаются отдельные технические и стилистические шероховатости, а также неполные библиографические ссылки. Хотя эти моменты не влияют на научную ценность, их следует устранять в будущей работе.

Приведённые выше замечания и вопросы не носят принципиального характера и не уменьшают значимость полученных результатов и не снижают её высокую оценку.

Сильные стороны диссертации

К числу несомненных достоинств работы относятся:

1. Чёткая экспериментальная логика и сквозная концепция.
   Все три основных экспериментальных блока (опсин *P. subcordiformis* в нейронах, таргетирование с помощью мотива канала Kv2.1, протезирование сетчатки коротковолновым колбочковым опсином) объединены общей идеей разработки и тестирования оптогенетических инструментов с учётом их биофизических, топографических и функциональных характеристик.

2. Широта методического арсенала.
   Автор уверенно использует современные подходы: пэтч-кламп в конфигурации «целая

клетка» на культурах, оптическое картирование светочувствительных полей на переживающих срезах неокортекса, *in utero* электропорацию, вирусную доставку генов в сетчатку, поведенческие тесты в водном лабиринте, конфокальную микроскопию и морфометрический анализ. Такой многоуровневый подход значительно повышает убедительность выводов.

3. Качественный анализ оптогенетических инструментов.
   Для опсина *P. subcordiformis* приведены не только амплитуды фототоков, но и оценка надёжности при импульсной световой стимуляции, а также спектральной светочувствительности в области 470–550 нм, что важно для практического применения в полностью оптических методических подходах.

4. Системное исследование и анализ таргетирования белка.
   Исследование мотива Kv2.1 проведено с аккуратным контролем концентрации плазмид и количественной оценкой распределения флуоресценции по соме и дендритам, а также с сопоставлением с литературными данными по мотиву Kv2.1 и другим таргетирующим мотивам. Это выводит работу за рамки чисто описательного эксперимента.

5. Практическая ориентированность блока по протезированию дегенеративной сетчатки.
   Автор не ограничивается морфологической демонстрацией экспрессии колбочкового опсина, а приводит поведенческие данные, интерпретируя их в контексте восстановления функционально значимой зрительной чувствительности у слепых животных.

6. Высокий уровень теоретического обзора.
   Литературный обзор охватывает широкий круг вопросов – от биофизики родопсинов до состояния клинических испытаний оптогенетических протезов сетчатки – и демонстрирует глубокую погружённость автора в тему.

Заключение

Диссертационная работа Иджиловой Ольги Степановны «Разработка оптогенетических инструментов на основе опсинов первого и второго типа» представляет собой завершённое научно-квалификационное исследование, содержащее совокупность оригинальных результатов по биофизической характеристике нового канального родопсина *P. subcordiformis* в нейронах, анализу ограничений соматического таргетирования с помощью мотива Kv2.1 и проверке эффективности коротковолнового колбочкового опсина для оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки.

Полученные результаты отличаются новизной, теоретической и практической значимостью, а используемые методы соответствуют современному уровню нейрофизиологических и молекулярно-биологических исследований. Содержание диссертации соответствует заявленной специальности 1.5.5 – физиология человека и животных, а её автор демонстрирует сформированность навыков самостоятельной экспериментальной работы и критического анализа полученных данных.

В заключение, по актуальности темы исследования, адекватности использованных методов, новизне, научно-практической значимости и объему полученных результатов, обоснованности научных положений и выводов диссертационная работа «Разработка оптогенетических инструментов на основе опсинов первого и второго типа» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 16.10.2024 № 1382), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Иджилова Ольга Степановна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и

животных.

Официальный оппонент:
Доктор биологических наук по специальности 03.00.13 – «Физиология человека и животных», профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной клеточной биологии и оптогенетики Центра изучения молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

П. Брежестовский Брежестовский П. Д.

«29» декабря 2025 г.

Почтовый адрес: 141701, Московская область, г. Долгопрудный,
Институтский переулок, д. 9,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Тел.: 8(968)499-77-16
Адрес электронной почты: pbreges@gmail.com

Личную подпись д.б.н. Брежестовского П.Д. заверяю:

ЗАВЕРЯЮ
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
УЧЕНОГО СОВЕТА МФТИ
ЕГ ЕВСЕЕВ