



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
**«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»**  
**(ФГБНУ «ИЭМ»)**

ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376  
тел.: +7 (812) 234-6868; факс: +7 (812) 234-9489; e-mail: iem@iemspb.ru; <https://iemspb.ru>

### **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОПОНЕНТА**

на диссертационную работу Костюка Александра Игоревича  
«Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.3 – Молекулярная биология

#### **Актуальность темы диссертационного исследования**

К развитию так называемого галогенирующего или гипогалогенного стресса приводит избыточный синтез хлорноватистой кислоты (НОСl) и ее производных, которые, будучи сильными окислителями, истощают запасы антиоксидантов и модифицируют биополимеры в случае хронических воспалительных заболеваний. Благодаря способности к генерации НОСl, а также ряда активных форм (псевдо)галогенов, миелопероксидаза (МПО) занимает особое место среди представителей семейства гем-содержащих пероксидаз позвоночных, в которое входят также лактопероксидаза, пероксидаза эозинофилов, тиреоидная пероксидаза и пероксидазины. Локализованная в нейтрофилах и моноцитах МПО с помощью НОСl и ее производных обеспечивает модификацию биополимеров бактерий и грибов, что является одним из механизмов врожденного иммунитета. Учитывая, что МПО является перспективной мишенью для противовоспалительной терапии, актуальной задачей, стоящей на стыке молекулярной биологии, аналитической химии, энзимологии и иммунологии, является создание биосенсоров для регистрации образования активных форм (псевдо)галогенов при развитии галогенирующего стресса. По соотношению чувствительности анализа к затратам на оборудование и расходные материалы оптимальными представляются аналитические подходы, основанные на флуоресцентных хемосенсорах. Однако вследствие чрезвычайной реакционной способности НОСl и ее производных практически все биополимеры и антиоксиданты конкурируют за НОСl с хемосенсорами, что сказывается на точности результатов анализа. На настоящий момент предложено немало

вариантов синтетических хемосенсоров для НОСІ, однако, при отсутствии консенсуса о «золотом стандарте» анализа среди специалистов каждый год выходит не менее десятка публикаций, предлагающих новые селективные по отношению к НОСІ хемосенсоры. Учитывая вектор на усложнение синтетических структур, растет актуальность разработки генетически кодируемых сенсоров на основе флуоресцентных белков, отличающихся более предсказуемым способом получения и возможностью их внедрения в системы гетерологичной экспрессии, в том числе клеточные культуры и трансгенных животных. Важно отметить, что из-за большего сродства МПО к бромид- и тиоцианат-ионам по сравнению с хлорид-ионами фермент генерирует помимо НОСІ значительные количества НОВг и НОSCN. Для последнего аналита не было предложено ни одного флуоресцентного хемосенсора до выхода оригинальных работ о биосенсоре Нурocrates, опубликованных по теме диссертационного исследования Александра Игоревича Костюка.

### **Общая характеристика диссертационного исследования**

Диссертация изложена на 230 страницах, построена по традиционному плану, содержит разделы «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Благодарности», «Список литературы». Раздел «Список литературы» содержит 695 ссылок на зарубежные работы, преимущественно это публикации последних 20 лет. Результаты работы иллюстрированы 19 рисунками и 5 таблицами. Следует отметить, что работа аккуратно оформлена, все рисунки выполнены в едином стиле, а в тексте диссертации легко ориентироваться.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В главе «Введение» четко сформулирована актуальность разработки и характеристики генетически кодируемых биосенсоров для исследований галогенирующего стресса. При описании преимуществ и недостатков современных инструментов анализа на основе флуоресцентных белков, а также объективных трудностей регистрации активных форм (псевдо)галогенов в системах *in vitro* и *in vivo* автору удалось выдержать разумный баланс необходимого и достаточного объема информации. Четко сформулированы цель и задачи исследования, включающие не только разработку, очистку и исследование аналитических характеристик генетически кодируемого биосенсора, селективного к активным формам (псевдо)галогенов, но и применение такого инструмента для анализа на культуре трансфектных клеток, на фагоцитирующих бактерии с биосенсором нейтрофилах, а также на модели воспаления у *Danio rerio*. Нечасто можно встретить такой значительный раздел, касающийся научной

новизны исследования. Помимо успешного использования биосенсора в живых системах, впервые показано участие галогенов в утилизации пероксида водорода в области раны у *Danio rerio*. Подробно описаны теоретическая и практическая значимость работы; степень достоверности результатов, а также данные об апробации, объеме и структуре диссертационной работы. Использованные формулировки дают полное представление о сути диссертационного исследования и позволяют высоко оценить его в мировом масштабе как по объему выполненной работы, так и по приоритетности результатов, полученных Александром Игоревичем. При этом важно отметить, что соискателем впервые в мире получен универсальный генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор на активные формы (псевдо)галогенов, позволяющий регистрировать развитие галогенирующего стресса в процессе фагоцитоза бактерий и при моделировании воспаления *in vivo*.

Глава «Обзор литературы» занимает около трети объема диссертации и состоит из трех частей, посвященных развитию галогенирующего стресса и методам его регистрации, разнообразию и физико-химическим свойствам флуоресцентных белков, классификации генетически кодируемых сенсоров с примерами регистрации окислительно-восстановительных процессов в живых системах. Глава написана хорошим научным языком и удачно иллюстрирована. Импонирует подробный и критический анализ ряда противоречивых фактов о галогенирующем стрессе, скрупулёзное описание не только достоинств, но и недостатков биосенсоров, основанных на флуоресцентных белках, а также ограничение круга рассматриваемых проблем во избежание роста главы до объема нескольких монографий. Следует отметить, что с помощью избранного принципа классификации биосенсоров Александру Игоревичу удалось емко представить принципы разработки аналитических инструментов на основе флуоресцентных белков.

В главе «Материалы и методы» описаны протоколы и методы создания генно-инженерных конструкций, кодирующих несколько вариантов Nurocrates, а также флуоресцентных белков, использованных для контрольных опытов; анализа созревания и реакционной способности биосенсоров в клетках *E. coli*; очистки и подготовки к анализу биосенсора и ряда его вариантов, использованных для контрольных экспериментов; регистрации физико-химических и аналитических характеристик биосенсоров; рентгеноструктурного анализа биосенсора; оценки эффективности Nurocrates для анализа галогенирующей активности МПО, культуры трансфектных клеток и нейтрофилов, фагоцитирующих бактерии с Nurocrates; регистрации активных форм галогенов и пероксида водорода при моделировании воспаления у *Danio rerio*. В целом раздел содержит достаточную для воспроизведения результатов информацию. Однако эта и

следующая глава не дают представления о количественном выходе Нурocrates при экспрессии в *E. coli*, не приведены электрофореграммы очищенного биосенсора. Не приводится источник и чистота МПО, использованной в работе, не очевидно, что принимается за единицу активности, учитывая как минимум две активности МПО и несколько вариантов их анализа.

Глава «Результаты и обсуждение» занимает около пятой части объема диссертации и начинается с подробного описания стратегии выбора NemR из *E. coli* в качестве основы для биосенсора среди бактериальных транскрипционных факторов, чувствительных к галогенирующему стрессу. Подробно описана процедура анализа 12 вариантов биосенсора, различающихся по позиции вставки *cpYFP* и делециям в области подвижной петли NemR<sup>C106</sup>, среди которых был выбран вариант NemR<sup>1-102</sup>-SAG-*cpYFP*-GT-NemR<sup>105-199</sup>, получивший название Нурocrates. При анализе свойств биосенсора была доказана его чувствительность для анализа генерации активных форм (псевдо)галогенов *in vivo*, селективность (за исключением пероксинитрита), возможность обратить реакции с помощью дитиотреитола и детектировать галогенирующую активность МПО. Замена С355S в Нурocrates была использована для контроля неспецифических реакций биосенсора. Именно такой вариант белка был кристаллизован и изучен с высоким разрешением с помощью рентгеноструктурного анализа, позволившего предложить механизм сопряжения С355 и хромофора. Подробно описана регистрация HOCl как при трансфекции клеток HeLa Kyoto плазмидой, кодирующей Нурocrates, так и при фагоцитозе нейтрофилами опсонизированных клеток *E. coli* с экспрессией Нурocrates в цитоплазме. Наконец, на модели воспаления *in vivo* у *Danio rerio* (с предварительной инъекцией мРНК, кодирующих Нурocrates) через 15 минут после ранения показана максимальная амплитуда продукции пероксида водорода и активных форм галогенов, при этом последние регистрировались на высоком уровне в течение часа после ранения. Следует отметить подробный анализ полученных результатов, сопровождающийся корректной интерпретацией собственных данных.

Глава «Заключение» обобщает основные результаты, в том числе преимущества разработанного биосенсора и перспективные направления для совершенствования его аналитических свойств.

Выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют поставленным задачам и подкрепляются полученными результатами.

**Научная новизна исследования** заключается в том, что Александром Игоревичем Костюком впервые в мире получен генетически кодируемый биосенсор, Нурocrates, позволяющий зарегистрировать не только HOCl, но и HOSCN. Разработка контрольного

неактивного варианта биосенсора Hurocrates CS и получение его трехмерной структуры высокого разрешения позволили обосновать механизм сопряжения активного сайта с хромофором при ответе биосенсора на активные формы (псевдо)галогенов. Достоверность полученных результатов и выводов подкрепляется достаточным числом наблюдений, использованием широкого спектра методов молекулярной биологии, биохимии и биофизики, а также иммунологии и клеточной биологии, соответствующих решению поставленных задач, а также адекватных методов математической и статистической обработки экспериментальных данных наряду с корректной интерпретацией результатов диссертационной работы. Следует отдельно отметить, что из статей по теме диссертационного исследования 1 статья опубликована в журнале Nature Communications (Q1, IF 17.763), 1 – в журнале Free Radical Biology and Medicine (Q1, IF 8.101), 1 – в журнале Antioxidants (Q1, IF 7.675), 2 – в журнале International Journal of Molecular Sciences (Q1, IF 6.208). Успешное прохождение процедуры рецензирования в таких престижных изданиях является объективно высокой оценкой разработанного инструмента для анализа галогенирующего стресса мировым научным сообществом.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Учитывая вклад галогенирующего стресса в развитие атеросклероза, сахарного диабета, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний, очевидно, что создание генетически кодируемых биосенсоров, селективных к активным формам (псевдо)галогенов, может быть полезно не только с точки зрения их практического применения для диагностики и разработки подходов к терапии перечисленных заболеваний, но и с позиций возможности детального анализа связи структуры и функции таких биосенсоров и их производных с целью усовершенствования аналитических характеристик. Если в конце прошлого и начале этого века врожденный иммунитет называли неспецифическим, апеллируя и к неспецифической окислительной модификации при респираторном взрыве нейтрофилов, то работа Александра Игоревича демонстрирует возможность специфической детекции активных форм (псевдо)галогенов с помощью белкового сенсора. С учетом развития технологий визуализации и возможностей регулируемой экспрессии биосенсора выполненная работа открывает широкие перспективы для прецизионного анализа воспалительных процессов, в том числе механизмов избегания патогенными микроорганизмами программ врожденного иммунитета.

#### **Оформление диссертации и автореферата**

Диссертационная работа и автореферат изложены хорошим литературным языком, не содержат опечаток, оформлены согласно существующим требованиям. Содержание автореферата в полной мере отражает содержание диссертации.

По результатам знакомства с диссертационной работой не возникло каких-либо существенных замечаний по сути изложения результатов и интерпретации полученных данных. В порядке дискуссии хотелось бы узнать мнение диссертанта по следующим вопросам:

1) В диссертационной работе были использованы термины «гипогалогенные» (стресс и кислоты) вместо терминов «галогенирующий стресс» и «гипогалоидные кислоты» из русскоязычного обзора Панасенко О.М. и соавт. 2013 года, цитируемого автором в англоязычном варианте [637]. Практически во всех реакциях с биополимерами участвует именно молекулярная форма хлорноватистой кислоты, а не с гипохлорит, а существенная часть  $\text{HOCl}$ , генерируемой в нейтрофилах, реагируя с таурином, превращается в N-хлорамин таурина, что не вполне соответствует термину «гипогалогенный». Чем руководствовался диссертант при выборе термина «гипогалогенный»?

2. Какие выходы биосенсора, в микрограммах с чашки Петри или миллиграммах из литра среды LB, были получены при экспрессии с помощью протоколов, описанных в разделе 2.3? Выявлены ли преимущества для экспрессии или очистки биосенсора у одного из штаммов (Shuffle® T7 и XL1-Blue)?

3. Под контролем какого промотора была экспрессия *Nurocrates* при трансфекции культуры клеток HeLa Kyoto? Возможна ли количественная характеристика продукции активных форм (псевдо)галогенов нейтрофилами в наномолях оксиданта на клетку?

4. Проводилась ли оценка токсичности и иммуногенности белкового биосенсора при экспрессии в клетках или мальках *Danio rerio*?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не снижают высокой оценки работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Костюка Александра Игоревича «Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.3 – Молекулярная биология, является завершенной научно-квалификационной работой, которая решает актуальную научную задачу разработки генетически кодируемого биосенсора для регистрации генерации активных форм

(псевдо)галогенов. По актуальности, объёму выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов настоящая работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней...», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04. 2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Костюк Александр Игоревич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией биохимической генетики

Отдела молекулярной генетики

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Институт экспериментальной медицины»

д.б.н.



Соколов Алексей Викторович

«16» января 2023 г.

197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,

Тел. +7 (812) 234-56-06.

<http://iems.spb.ru/>

E-mail: [biochemsokolov@gmail.com](mailto:biochemsokolov@gmail.com)



Хабарова О.В.