

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

**Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН
15 февраля 2023 года**

**Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

Костюка Александра Игоревича

**по теме: Исследование гипогалогенного стресса
с помощью генетически кодируемых биосенсоров**

Специальность 1.5.3 – “Молекулярная биология”

Москва – 2023

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 15 февраля 2023 года.

Зам. председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1.	Д.ф.-м.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
2.	Д.ф.-м.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
4.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
6.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
7.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
8.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
9.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
10.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
11.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
12.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
13.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
14.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
15.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
16.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
17.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
18.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
19.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Мы начинаем работу. Очередное заседание нашего диссертационного совета. Сегодня мы рассмотрим кандидатскую диссертацию Костюка Александра Игоревича на тему “Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров”. Диссертация представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – “Молекулярная биология”. Научный руководитель – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Билан Дмитрий Сергеевич. Официальные оппоненты – Савицкий Александр Павлович, доктор химических наук, профессор, заведующий Лабораторией физической биохимии Института биохимии имени Баха Федерального исследовательского центра Фундаментальные основы биотехнологии РАН. Второй оппонент – Соколов Алексей Викторович, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией биохимической генетики Отдела молекулярной генетики Института экспериментальной медицины Министерства науки и высшего образования. Ведущая организация – Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук. Владимир Александрович, пожалуйста, представьте соискателя.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Материалы личного дела: Костюк Александр Игоревич, Российская Федерация, окончил Кафедру биохимии Биофака МГУ в 18-ом году. С 17-ого по 20-ый – инженер-исследователь. С 20-ого по настоящее время – младший научный сотрудник Группы метаболических основ патологии нашего института, ИБХ РАН. С 19-ого года по настоящее время – младший научный сотрудник Российского национального исследовательского медицинского университета имени Пирогова... Вот такое совместительство. С 19-ого по 22-ой год – аспирант ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности «Молекулярная биология» сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в Группе метаболических основ патологии ИБХ РАН. Научный руководитель – Дмитрий Сергеевич Билан... ИБХ РАН... По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых изданиях. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно – 23-его ноября 22-ого года, и все необходимые документы в деле имеются.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Владимир Александрович. Уважаемые коллеги, есть ли у кого вопросы по формальным... по формальной стороне? По личному делу соискателя? Вопросов не вижу. Тогда, Александр Игоревич, пожалуйста, представьте основные результаты вашей работы. Регламент – 20 минут.

Соискатель, А.И. Костюк:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Так, уважаемые коллеги, пожалуйста – вопросы.

Д.х.н., Н.В. Бовин:

Вы с самого начала вашего доклада сделали такой акцент на «псевдоности». То есть, на изотиоцианат. И это по всей работе дальше идет, вот эта «псевдоность». И она доходит до выводов. А вопрос такой: насколько... как различается концентрация хлорид-аниона и изотиоцианат-аниона внутри клетки? То есть, есть ли какой-то биологический смысл в изучении вот именно процесса с этим анионом?

Соискатель, А.И. Костюк:

Да, большое спасибо за вопрос. Конечно же, концентрация хлорид-анионов, она, на самом деле, на порядки выше. Но дело в том, что у ферментов, которые производят гипогалогенные кислоты и псевдогипогалогенные кислоты, у них такие кинетические параметры, что они преимущественно взаимодействуют с тиоцианат-анионами. То есть, они взаимодействуют с ними на порядки быстрее. И поэтому считается, что в физиологических условиях по результатам моделирования, например, миелопероксидаза производит до 50% гипотиоциановой кислоты. То есть, там примерно 50% хлорноватистой, 50% гипотиоциановой – по уходу пероксида водорода. Дальше, эозинофильная пероксидаза производит примерно 50 на 50 гипотиоцианат и гипобромит. А лактопероксидаза, которая находится в слюнных железах, молочных железах, дыхательных путях, она вообще преимущественно производит гипотиоцианат. Вот, то есть, на самом деле его концентрации достаточно велики. При этом они сильно влияют... зависят от диеты – то есть, например, если мы говорим о странах Южной Америки, о странах Африки, то там люди, например, часто употребляют как один из основных источников углеводов маниок. И в маниоке большое количество цианогенных гликозидов, поэтому у них концентрация тиоцианата очень высокая в крови, соответственно будет большая концентрация гипотиоциановой кислоты. У курильщиков очень сильно повышаются концентрации тиоцианата тоже. Вот так. А если говорить о том, насколько там доказано, что он играет роль. Ну, показано, например, что огромная роль у гипотиоциановой кислоты в развитии атеросклероза. Надеюсь, что я ответил.

Д.х.н., Н.В. Бовин:

Да, спасибо. И тогда еще сопровождающий вопрос. А сам ион тиоцианата, он исключительно экзогенный, или организм его умеет производить?

Соискатель, А.И. Костюк:

На самом деле, он как раз не экзогенный, он абсолютно эндогенный по большей части. И производится он следующим образом – когда мы потребляем цианогенные гликозиды, то мы должны цианид детоксифицировать. И основной путь, один из основных путей, детоксификации – это митохондриальный фермент роданаза, который как раз превращает его в тиоцианат.

Д.х.н., Н.В. Бовин:

Спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Так, коллеги, еще вопросы? Ну, я себе позволю тогда тоже вопрос задать. Когда лиганд связывается, вот, с вашим сенсором, да, там происходит образование ковалентной связи, как вы сказали, да? А чем тогда обеспечивается, вот, обратимость, то есть, разрыв этой ковалентной связи? Как достигается, насколько это, как бы, устойчивая, надежно работающая реакция там и так далее?

Соискатель, А.И. Костюк:

Да, спасибо, это, на самом деле, очень хороший вопрос, который нас самих очень беспокоит. Я отвечу на него следующим образом. Тут будет немножко сложный ответ. Дело в том, что образование ковалентной связи было показано для транскрипционного репрессора NemR, это статья Грея и соавторов, выполненная в лаборатории профессора Урсулы Джейкоб. Что же говорят наши результаты, вот конкретно вот эти, что у нас по всей видимости сульфенамидная связь – она либо не образуется, потому что, если лизина нет, сенсор все равно отвечает, либо ее образование не является необходимым для ответа. Поэтому мы предполагаем... но при этом цистеин нужен. Поэтому мы предполагаем, что

наш сенсор работает на механизме образования сульфеновой кислоты. То есть, цистеин, соответственно, атакует хлорноватистую, например, кислоту. Получается S-Cl, дальше он гидролизуется и получается сульфеновая кислота. Что касается обратимости, то мы видим ее в результате обработки DTT. И мы видим ее, соответственно, в клетках на модели HeLa Kyoto. Какие конкретно антиоксидантные системы за это отвечают – это интересный вопрос. Это, ну, скорее всего либо глутаредоксины, либо тиоредоксины, но это нужно сейчас проверять. И, вот, мы продолжаем сотрудничать с нашими коллегами из Бельгии. Вот, я их уже упоминал косвенно – это лаборатория Йориса Мессенса. Они умеют выделять *in vitro* вот эти разные антиоксидантные системы, и сейчас они пытаются проверить, какая именно антиоксидантная система лучше взаимодействует с нашим сенсором.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Да, но тогда у вас же есть структура сейчас кристаллографическая, да? И там, похоже, нет этой, если я правильно понимаю, там нет этой ковалентной связи. Там сетка водородных связей.

Соискатель, А.И. Костюк:

Да, по поводу кристалла – во-первых, это кристалл CS, то есть это кристалл инактивированного мутанта. Потому что сам сенсор давал недостаточно хорошие, просто, значения – его не удалось расшифровать. Что касается механизма, то идея заключается в следующем – что, по всей видимости, когда вот здесь цистеин окисляется, то это неизбежно влияет на распределение электронной плотности в системе, и это просто будет влиять на конформацию, ну, допустим, подвижной петли. И это будет влиять, соответственно, на расстояние между вот этими аминокислотами, может быть, на перенос заряда, что будет влиять, соответственно, на микроокружение хромофора. И там в общем-то достаточно небольших изменений, чтобы, например, у него изменялись квантовые выходы или рKa.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Ну, тогда следующий вопрос. Система у вас... в модельных, по крайней мере, экспериментах, ну и на клетках тоже, работает устойчиво. То есть, надежно, да. То есть, вы меняете концентрацию лиганда, она реагирует. Потом возвращается в исходное состояние. А вот в такой системе, где все завязано на несколько водородных связей последовательных, которые должны образоваться. То есть... На мой взгляд, такая система не будет надежно работать, потому что есть вода, которая конкурирует за водородные связи. То есть, чтобы, вот, воспроизводить весь этот цикл, ну, какая-то нужна такая более робастная, как говорится, система. Вот ваше видение какое?

Соискатель, А.И. Костюк:

Ну... На самом деле, тут сложно сказать. Если, вот... У меня нет, к сожалению, – я к такому вопросу не готовился, – у меня нет тут, на самом деле, картинок. Но один из немногих сенсоров редокс, для которых были вот полностью получены кристаллы в окисленном, в восстановленном состояниях, это – roGFP. Ну, известный сенсор на редокс-статус глутатиона. И там, если сравнивать структуры – при том, что roGFP отвечает в разы, у него очень большой ответ – там, на самом деле, ну какие-то просто минимальные изменения. То есть, в реальности там достаточно просто минимальных сдвигов цепей относительно друг друга, чтобы в хромофоре, ну, изменилась тоже электронная плотность и так далее. Ну, я согласен, что, конечно, хотелось бы получить кристалл самого сенсора. Причем, желательно, и в окисленном, и в восстановленном состояниях. Но, вот, у наших коллег пока не получилось.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Все впереди. Спасибо. Так, коллеги, еще вопросы возникли? Я не вижу. Тогда, Александр Игоревич, пожалуйста, присаживайтесь. Так, Дмитрий Сергеевич, вам слово. По соискателю, пожалуйста, выскажитесь.

Научный руководитель, к.б.н., Д.С. Билан:

Здравствуйте, уважаемые члены диссертационного совета, дорогие коллеги. Я очень рад, что судьба познакомила меня с Александром Игоревичем, человеком столь одаренным и столь разносторонним. Он пришел в наш коллектив в студенческие годы, и он, и еще несколько ребят, можно сказать, стояли у истоков формирования нашего коллектива. Поэтому я наблюдал, как Александр Игоревич набирается опыта, и одновременно с этим его развитие способствовало развитию нашей команды, меня в том числе. Александр Игоревич никогда не боялся браться за сложные проекты, и любой проект, за который он брался... дела там резко налаживались. Будь то, капризный белок, который выделялся только в его руках, или сложный биохимический метод, который в его руках становился легким и наглядным. И я бы хотел выделить два главных качества Александра Игоревича. И важно даже... Не сколько эти качества по отдельности, сколько их уникальное сочетание в одном человеке. Первое – это научное любопытство. Я думаю, что мне не дадут соврать люди, с которыми он успел провзаимодействовать, в том числе отдел аспирантуры и экзамены... люди, которым он их сдавал. Александр Игоревич – это кладезь знаний. Он в курсе всех научных новостей, очень широкий кругозор, и он эти знания активно черпает и активно дает. То есть, он является автором многочисленных курсов для школьников, для студентов. И опять же очень широкий диапазон – начиная от лекций по биоорганической химии для талантливых школьников и заканчивая семинарами по статистике и практикумами по биохимии. А второе уникальное свойство... Мы у себя в команде это называем – научное занудство. И в данном случае это комплимент, потому что Александр Игоревич очень щепетилен к анализу результатов своей работы и чужой работы. Это очень важно, когда человек может посмотреть на свою работу с позиции ревьюера. И даже у нас в команде бывает, что выполнена какая-то задача, и мы говорим – да, вот это все работает, или вот это не работает, нужно закрывать. Александр Игоревич может сказать, что данные сырые, показывать рано. Неоднократно опровергал собственные же результаты. Это очень ценно. Поэтому, когда ко мне подходят младшие сотрудники или студенты и говорят – вот, получены результаты, Саша посмотрел – для меня это знак качества, я понимаю, что этим результатам можно доверять на 100%. Александр Игоревич пишет статьи, пишет гранты, делает первые шаги продвижения каких-то своих идей, появляются первые ученики. Поэтому я уверен, что его ждет очень насыщенная и интересная научная жизнь. И степень кандидата наук является первой такой ступенью вот в этой взрослой научной жизни. И я считаю, верю, что он, конечно же, достоин этой степени. Большое спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо, Дмитрий Сергеевич. Так, теперь переходим к заслушиванию письменных отзывов. Владимир Александрович, пожалуйста, ознакомьте нас.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Так, значит, во-первых, заключение организации, где выполнялась работа. Естественно, это наш институт, Институт биоорганической химии.

(зачитывает заключение организации, где выполнялась работа)

Соответственно, начинается с неких биографических данных, о чем мы уже услышали. Научный руководитель только что выступал, Дмитрий Сергеевич Билан. Тема диссертационной работы утверждена ученым советом нашего института в 19-ом году 18-ого декабря. Далее, актуальность темы исследования. Ну, понятно, что сенсоры на основе

генетически программируемых белков – это такая тема огромная, и создание белкового индикатора, специфичного в отношении (псевдо)гипогалогенных кислот, вот сейчас, благодаря вот этим работам, воспринимается не просто как актуальная, но и как практически-осуществимая задача. То есть, и актуальность, и осуществимость. Научная новизна – создан и детально охарактеризован первый в мире генетически кодируемый сенсор для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. То есть, впервые создан. Практическая ценность настоящей работы состоит в расширении современной палитры аналитических техник для регистрации (псевдо)гипогалогенных кислот и их производных. Далее, ценность... Это подчеркнuto. Степень достоверности – результаты, представленные в настоящей работе, были получены с использованием широкого арсенала современных методик. Достоверность сомнений не вызывает. Личное участие... Исследования по теме диссертации осуществлялись с 17-ого по 22-ой годы. Подавляющее большинство экспериментальных и теоретических исследований по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии. По результатам – шесть статей в хороших журналах опубликованы. И, соответственно, в результате рассмотрения эта диссертация рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология». Соответственно, подписано секретарем семинара, Храмова, зам. директора Ямпольский. Утверждено директором нашего института, академиком Александром Габриловичем Габриловичем. Это, что касается, заключения организации.

Теперь отзыв ведущей организации. Здесь в качестве ведущей организации у нас Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук.

(зачитывает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный).

Соответственно, отзыв полностью положительный. Опять же говорит... говорится в начале об актуальности темы, о важности развития вот этой тематики генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. И вот здесь подчеркивается – однако до сих пор не были разработаны индикаторы, которые были бы специфичны в отношении (псевдо)гипогалогенных кислот. Ну, это подчеркивается актуальность данной работы. Содержание диссертации – построена по традиционному плану, включает в свой состав разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и, соответственно... Соответственно, «Введение»... «Обзор литературы» написан грамотным научным языком, прекрасно проиллюстрирован и в полной мере описывает теоретическую базу диссертационного исследования. «Материалы и методы» содержат всю необходимую информацию об экспериментальных методах и подходах. В разделе «Результаты и обсуждение» описывает разработку генетически кодируемого сенсора. Ну, фактически здесь то же самое, что мы только что слышали, поэтому я не буду на этом останавливаться. Про Nurocrates – функционален. Вот, полученный инструмент подходит для многократной регистрации актов окисления/восстановления. При помощи Nurocrates автору удалось визуализировать динамику (псевдо)гипогалогенного стресса, с которым сталкиваются бактерии, оказавшиеся в полости фагосомы нейтрофила. Далее, Nurocrates был использован в модели *in vivo* в мультипараметрическом режиме с красным сенсором пероксида водорода NuPerRed, и установлено, что ампутация хвостового плавника мальков *Danio rerio* приводит к развитию (псевдо)гипогалогенного стресса. При этом концентрация активных форм галогенов в ткани остается высокой как минимум на протяжении часа после проведенной операции. «Заключение» и «Выводы» сформулированы четко. Научная новизна – ну, принципиально новый аналитический инструмент создан. Степень обоснованности – все... Приведены убедительные контроли на каждом этапе. Замечания и вопросы. Хотелось бы узнать комментарий автора – для каких клеток кроме нейтрофилов разработанный биосенсор будет эффективен в использовании? Второе – можно ли, и имеет ли смысл, иммобилизовать биосенсор Nurocrates на поверхности клеток для

исследования выхода (псевдо)гипогалогенных кислот в окружающую среду? Например, таким образом можно было бы наблюдать изменение уровней этих лигандов при поглощении бактериальных клеток нейтрофилами со стороны нейтрофилов. Это замечание не носит... Эти замечания не носят принципиального характера и не снижают... Соответственно, в заключении пишется, что работа полностью соответствует всем положениям ВАК о присуждении ученых степеней. Соответственно, соответственно... Она соответствует искомой ученой степени, ну, а сам – достоин присуждения этой степени. Отзыв на диссертационную работу подготовлен главным научным сотрудником ИМБ РАН Митькевичем Владимиром Александровичем. Это доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник. Ну, и соответственно этот отзыв утвержден директором ИМБ РАН Софией Георгиевной Георгиевой.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Так, Александр Игоревич, пожалуйста, ответьте на замечания из отзыва ведущей организации.

Соискатель, А.И. Костюк:

По поводу первого замечания. Ну, это не замечание, вопрос. Для каких клеток сенсор может быть полезным? На мой взгляд, его нужно разделить, ответ, на две части. Первая часть – это клетки, которые являются генераторами окислительного стресса. И вторая часть – это клетки, которые являются мишенями окислительного стресса. Если говорить о клетках, которые генерируют окислительный стресс, то нам в первую очередь кажется, что сенсор будет эффективен и полезен при изучении эозинофилов, потому что понятно, что эозинофилы содержат пероксидазу эозинофилов и производят гипобромит. И также, это менее очевидно, он будет интересен для изучения макрофагов и микроглии, потому что, несмотря на то, что в норме данные клетки содержат достаточно малые количества миелопероксидазы, известно, что в патологических контекстах они реиницируют ее экспрессию и, соответственно, могут становиться источниками хлорноватистой, например, кислоты. Показано, что это может происходить при нейродегенерации. Это может происходить при атеросклерозе. Поэтому было бы интересно изучить их собственный редокс-метаболизм. И вторая часть ответа – про клетки-мишени окислительного стресса. Ну, здесь, на самом деле, если мы говорим о клетках позвоночного, то это могут быть любые клетки. Потому что любые клетки в организме позвоночного способны сталкиваться с воспалительными реакциями. Но, то, что, например, нас в лаборатории больше интересует и то, что нам кажется очевидным – это нейроны, опять же из-за нейродегенерации, и это клетки эндотелия, потому что известно, что гипогалогенный стресс очень выражен именно в модели, например, атеросклероза, в моделях коронарных синдромов. Ну, и конечно же, его можно экспрессировать в широком кругу бактерий, и я думаю, что это будут очень интересные исследования о том, как бактерии сражаются с иммунной системой, и кто кого побеждает. Второй вопрос касался иммобилизации сенсора на поверхности клеток. Да, конечно, технически, поскольку это белковая молекула – ее можно при экспрессии таргетировать на внешнюю поверхность мембраны. Однако, надо понимать, что внешняя поверхность клетки – она является для клетки внешней средой, и там совершенно другой редокс-статус. То есть, там нет такого количества антиоксидантных систем, и поскольку Hupocrates, все-таки, является редокс-сенсором у нас нет уверенности, что он будет в течение длительного времени находиться в восстановленном состоянии во внешней среде, потому что все-таки... Ну, пускай он относительно селективен, даже, я бы сказал – хорошо селективен. Селективность – это вопрос кинетики. Если мы говорим о длительных временах, то окисление кислородом, пероксидом – это все может происходить. Вот. Поэтому я бы сказал, что разумнее экспрессировать сенсор и таргетировать его на внутреннюю сторону мембраны. И мы

сейчас как раз в лаборатории получаем палитру таких конструкций для субклеточной локализации сенсора, и у нас есть конструкция для его таргетирования на внутреннюю поверхность мембраны. Соответственно, там он будет находиться в цитозоле, он будет поддерживаться в восстановленном состоянии, и тем не менее, все равно, сможет регистрировать редокс-события в области плазматической мембраны. Вот, мне кажется, что я ответил.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Так, уважаемые коллеги. Других письменных отзывов на диссертационную работу не поступило в совет. Поэтому мы переходим к дискуссии, и слово предоставляется Александру Павловичу Савицкому. Это официальный оппонент по диссертационной работе.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:

(излагает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный)

Уважаемые коллеги, я всегда с большим интересом берусь оппонировать работы, которые, вот... Ну, в моем понимании, так из древа, это уже ветвь, Севы Белоусова. И меня все вот эти вот работы, которые выходят... Начиная от его самого работы. Я оппонировал его кандидатскую, докторскую. Вот, они меня всегда удивляют очень таким вот прекрасным биологическим взглядом на эти сенсоры. Потому что, действительно, если взять цветные флуоресцирующие белки – они всем плохи. По любым параметрам. Перебирайте фотохимические... Все плохо. Кроме одного – они генетически кодируемые. Все. Вот это перекрывает все остальное. И вот эта вот именно генетическая кодируемость, возможность использования в биологических системах, мне как раз очень нравится в тех работах, которые выполняет вот эта группа. Поэтому еще одно небольшое такое замечание... Вообще-то, как-то мне довелось оппонировать диссертацию за рубежом, и там четко разделили две вещи – есть ревьюер, есть оппонент. Вот, ревьюер должен сказать объективно. А оппонент вообще не имеет права сказать положительное слово, он оппонирует, он должен говорить только недостатки, которые он увидел в данной работе. У нас это, хотя говорится «оппонент», но по традиции считается, что вот... у нас оппонент он одновременно и ревьюер. Он должен объективно оценить всю работу в целом. Но вообще-то говоря с моей точки зрения был настолько очень хороший доклад, прекрасно сделанный, который совершенно четко показывает в общем-то положительные качества данной работы. Они у меня, конечно же, здесь перечислены – и актуальность, и значимость. Вот. Но, чтобы сэкономить ваше время, я на этой части останавливаться не буду. Но я специально сделал такое введение, чтобы вы не думали, что я только вот читал и искал какие-то, вот, недостатки и заковырки в этой работе. Все объективно, вот, то, что вы слышали, я полностью, вот, как сказать... мне понравился доклад, поддерживаю, разделяю. Все сформулировано было абсолютно объективно, абсолютно четко. Но если переходить... Поэтому, с позволения председателя, я эту часть опускаю, чтобы сэкономить время. Вот. И, уже переходя к рассмотрению, собственно говоря, работы. Это действительно пионерская работа, которая сделана именно пионерски. Я бы сказал так. Впервые сделан новый прорывной сенсор, нового типа. И если посмотреть, как была построена работа, конечно, это довольно интересно. Ну, первое, конечно, с чего начинается все это – литературный обзор. Я должен сказать, что я был поражен этим литературным обзором – 695 работ. Ссылки. Ну, тут не удивляет теперь... Да, и где-то, наверное, треть – это вот список литературы, да. Огромный список литературы. И поэтому вот такая энциклопедичность, она даже отслеживалась сейчас и в ответах, вот. Она не удивляет на фоне такой начитанности, потому что я любопытства ради сам пытался так еще поковырять, когда мы беседовали с диссертантом, действительно ли он все эти работы смотрел. Но, оказывается, да. Вот. Поэтому эта цифра меня удивила – 695. При этом я должен сказать, что обзор состоит из трех глав, и больше всего мне понравилась

первая глава, в которой он достаточно подробно разбирает, вообще-то говоря, роль (псевдо)гипогалогенных кислот в биохимии и каково состояние этой проблемы. Какие мишени выявлены, причем перебирает действительно огромное количество литературы. Вот. И при этом мне, как кинетику по образованию, что казалось интересным, он уделяет большое внимание кинетическому аспекту. С тем, чтобы действительно не промахнуться с этим сенсором. Он показал наглядно очень хорошую картинку. Вот. Но я бы сказал так... Хотя вот была сделана такая кинетическая работа, но мне было как раз интересно... Вот ту классификацию, которую пытался провести диссертант, ее, конечно, сделать трудно при таком огромном массиве. Но мне кажется, можно было бы попробовать выделить более узкую ветвь, и попробовать в общем-то разобраться во всем том, что делает гипохлорит в живом организме, просто по типу функциональных групп, на которые он действует. И тем более, что здесь есть целая серия загадок непонятных. Ну, я, например, работаю с такой группой ферментов как каспазы. Это цистеин-зависимые... У них в активном центре цистеин. Казалось бы, в первую очередь цистеин ведь должен убиваться гипохлоритом. Нет! Оказывается, воздействие гипохлорита приводит к активации каспаз. Ну, конечно, можно поискать ответ, связанный с тем, что в организме это все находится в виде прокаспаз, и, скорее всего, активный центр закрыт, и SH-группа закрыта от химической атаки. Но, тем не менее, вот таких вот парадоксов здесь довольно много. И если бы вот автор больше внимания при такой энциклопедичности уделил классификации, собственно, самих реакций функциональных групп, может быть, здесь появилось какое-то... выкристаллизовалось бы какое-то интересное ядро. Вот, при этом, конечно, что радует, что он не замыкается внутри флуоресценции, смотрит объективно – вообще, какие другие подходы существуют, кто как пытался все это определять, и совершенно объективно определяет, что, да, вообще-то все остальные методы... что-то противопоставить реальному измерению в живом организме, кроме генетически кодируемого, на сегодняшний день пока трудно. И как здесь ни возлагаются огромные надежды на МРТ, пока МРТ не обладает таким разрешением и такими возможностями. И поэтому эта методика работает хорошо. Значит, что касается второго блока. Ну, вообще-то говоря, я бы сказал так – не то, что он меня разочаровал, но здесь такие общеизвестные вещи. Дело в том, что цветные белки известны уже, изучаются 30 лет, больше 30 лет. В общем-то это все уже такие вещи, которые входят в курсы лекций для студентов, в учебники, и ничего там особенно такого, вот, интересного в обзоре литературы диссертации доложить трудно. А вот третья часть меня заинтересовала и, с одной стороны, понравилась, а с другой стороны, немножко разочаровала. Потому что третья часть, собственно говоря, посвящена сенсорам на основе циркулярной пермутации. Ну, или круговой, как говорят любители русского языка. Круговая пермутация. И там, в этой группе, она, кстати, очень сложная, эта группа. Но в ней выделяется... И открыта она впервые была не на, естественно, не на цветных белках, на других генах. На цветных белках впервые ее Роджер Чен применил, очень эффективно использовал. А там есть несколько разных механизмов. И один из них, вот, это группа, так называемых, рациометрических сенсоров. И вот это было как раз мое разочарование. Потому что, собственно говоря, попытаться разобраться в механизме рациометрических сенсоров... А это просто сложное конформационное равновесие, которое подсказала сама природа, потому что дикий тип GFP, он содержит два конформера – один протонированный, другой – нет. И они находятся в динамическом равновесии. Причем эта скорость этого динамического равновесия очень интересна... Это довольно быстрые процессы, вот. А эти рациометрические сенсоры – это то же самое, только когда за счет искусственных C- и N-концов новых, вот, вводят новое искусственное... Пытаются добиться нового искусственного равновесия между протонированной и депротонированной формой. И здесь как раз главную-то роль играет не рентген, я вообще сомневаюсь, что на этом пути будет что-нибудь путное найдено для таких сенсоров, хотя вот рентген был получен... Но, я обычно студентам говорю: рентген – это нулевое приближение. Вы с него стартуете. Вы

узнаете положение ориентировочное, а дальше начинается динамика белка, и вы от нее никуда не денетесь. Он будет все время двигаться, белок. И вот как раз основное-то объяснение, я думаю, кроется как раз в том, что нужно было больше внимания уделить вот этому аспекту, но, к сожалению, он в работе не был совершенно разобран. Ну, что касается раздела, вот, «Материалы и методы». В принципе, написано грамотно, четко, читается легко, довольно интересно. Вот. Демонстрирует широту методов, начиная от классических таких биохимических методов и, заканчивая довольно сложными разного рода биологическими... Или как я тут с удивлением услышал термин “мокрая биология”. Вот, я так удивился этому термину. Но в общем-то такие хорошие биологические методы, включая объекты *in vivo* – *Danio rerio*, которую мы больше называем как zebrafish. Интересна тем, что она абсолютно прозраченькая. Поэтому микроскопом можно заглянуть куда-угодно далеко, поэтому этим обусловлен только выбор объекта. И, надо сказать, что выборы объектов очень грамотные, обоснованы. Но, что мне немножко не понравилось, я бы сказал так – очень много лабораторного сленга. Вот. И, ну, к сожалению, я вот уже часто легко обнаруживаю – человек вообще-то говоря читал русскоязычную литературу или нет. Если я вдруг читаю, что что-то гасит флуоресценцию – значит, он никогда русскую литературу не читал научную на эту тему. Потому что «тушитель» по-русски, «тушит» флуоресценцию. Ну, и здесь, похоже, такой же фокус. Потому что «дихроические» зеркала превратились в «дихроматические». Хотя дихроическую пластинку предложил Брумберг из Санкт-Петербурга. И это вообще, можно сказать, практически русский термин. Это дихроическое зеркало. Вот, и некоторые другие тоже оптические термины... Ну, скажем, меня удивили... «Барьерный» фильтр – это сугубо сленг. Есть узкополосный, широкополосный, отсекающий фильтры. Вот. Что имел автор, когда говорил «барьерный» фильтр? Ну, это сленг. Непонятно. И вместо «облучения светом» у него вдруг оказалась «обработка светом». Вот. Ну вообще-то это такой вот сленг, который... Ну, я не знаю, конечно, вот, как людям, не знакомым с темой, это воспринимается. Но это в общем-то нарушает строгость восприятия, научную строгость восприятия того, что написано. Ну и конечно, вот, «Результаты и обсуждение» уже. Собственно, обсуждение начинается с того, как был выбран этот белок, NemR из *E. coli*, вот. И было сделано 12 генетических конструкций на основе, в принципе, тех работ, которые делались уже по NuPerRed. В принципе, эти сиквенсы... и линкеры... довольно сложная работа по линкерам. Ну, и из этих 12 конструкций, что тоже немаловажно – немалый объем работы, удалось отобрать в общем-то одну наиболее перспективную с более-менее приличным динамическим диапазоном. Ну, вот здесь все основные достоинства были... Говорю, мне доклад очень понравился, очень четко сформулирован. И поэтому я опять не буду тратить на это время. Вот. Но хотел бы обратить внимание, что, конечно, вот, автор упирается в диапазон pH 6.7-8.2, хотя на картинках я увидел и желаемый диапазон – 4.5. Вот. Потому что, вообще-то говоря, в лизосомах, через которые очень часто многие такие вот атаки идут по уничтожению микроорганизмов, pH спускается до 4.5-5.0. И там активность максимальная... Активность разного рода ферментов, которые атакуют враждебные белки и организмы. Ну, еще раз говорю – очень хороший разбор был кинетический. Но, что меня при этом удивило, что, вообще-то говоря, ну, скажем так, здесь все реакции псевдо-второго порядка. Бимолекулярные реакции. И автор удивляется вот различию этих констант. Ну, вообще-то говоря, конечно, самое простое, что приходит в голову, когда бимолекулярная реакция – сравнить коэффициенты диффузии. Тем более, что молекулярные массы, судя по тому, что сопоставляется, и говорится, что там большие различия... очень большие. И, кроме того, там еще вплетается так называемый ориентационный фактор. Вот. Поэтому, если бы с этой точки зрения проанализировать, было бы, скажем так, немножко интереснее. Работа бы, как я в таких случаях говорю, работа бы только выиграла, если бы автор сопоставил эти вещи. Вот. Ну, и очень хорошая часть уже, собственно, по практическому применению как на нейтрофилах, так и на *Danio rerio*. Вот, очень интересные и красивые

результаты. Действительно впервые, это пионерские работы, впервые показано, что это происходит... такое вот обращение. Здесь, как бы так, системы двойного уровня: перекись водорода – это первая атака, острая атака. А, на самом деле, гипохлорит – это вот в рамках масштабов клетки, это уже, как сказать, задержанная атака. Потому что это намного более долгоживущее соединение, но агрессивное, химически-активное, агрессивное... нежели перекись водорода. И поэтому их атака осуществляется уже в течение, там, часов и даже больше. Вот, поэтому очень хорошо, что авторы разработали контроль, потому что одна из проблем, которая в докладе почему-то не прозвучала, что в общем-то сенсор является еще и температурно-чувствительным. Это будет очень важная и актуальная вещь, поскольку пока эксперименты делались просто *in vitro*, вот, на нейтрофилах. И эксперименты делались на хладнокровной рыбке *Danio rerio*. Ничего страшного. Но когда вы переходите к каким-то теплокровным животным, и начинается воспаление – там у вас поползла вверх одновременно температура. И поэтому... Но хорошо, что у них есть вот этот контроль, который будет позволять отслеживать, в том числе, и температурные эффекты. Вот. Ну, и в качестве, так, совсем уж такого буквоедства, вот... я уже сказал про коэффициенты диффузии, что не мешало бы их оценить. Вот. Второе... Ну, я не совсем понял, конечно, вот такой вот смысл написания – практически во многих местах автор действительно очень четко прослеживает всю литературу, вынимает все эти константы, но почему-то возле них ставит знак... математический знак «~». При этом свои данные он приводит вполне грамотно – с указанием доверительных интервалов. Вот, в чем смысл этого знака «~»? Ну, наверное, он пояснит, что он имел в виду. Вот. И, например... Ну, еще, конечно, то, что режет слух любого фотохимика – это когда «краситель» обзывают «краской». Краской красят заборы! Традиционный ответ. Вот. На... Да, на рисунке... Но это просто вот ошибка. На рисунке 32В, Г и 3Б автореферата неправильна подпись на оси абсцисс. Там написана «длина волны», а должно быть «мольное соотношение». Ну, это уж совсем такое буквоедство. И вообще, конечно, вот, в некоторых местах, например вдруг ни с того, ни с сего появляется Cys355... Начинается вокруг него в сенсоре обсуждение, а на самом деле это тот же самый Cys106. Надо было сказать, что в данном случае нумерация уже пошла по полной длине сенсора, причем up-stream стоит цветной белок, и поэтому все сдвигается резко, вот, там на эти 250 аминокислот цветного белка. Вот. Ну, в общем-то сказанные все эти замечания, никак не влияют на положительную оценку. Я еще раз подчеркиваю – пионерская работа, это действительно пионерская работа, где впервые сделан такой вот сенсор на реагенты, которые, казалось бы... как их поймать в живой природе? Потому что гипохлорит... его роль давно уже обсуждают, но вот как его поймать, как его увидеть – все методики крайне трудоемки, те, которые вот чисто химические, а здесь вот действительно создан генетически кодируемый сенсор, который впервые позволяет это отслеживать. И мы все больше и больше погружаемся в биохимию *in vivo*, в реальные процессы, которые можно наблюдать в живом организме в соответствующем таком пространственно-временном континууме каком-то. Ну, и в конце я зачитаю уже фразу, которую требует ВАК. По всем критериям работа Костюка «Исследование гипогалогенного стресса с помощью генетически кодируемых биосенсоров» отвечает требованиям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утверждено постановлением Правительства РФ от 24.09.13 года №842 с изменениями в Постановлении правительства РФ от 21.04.16 года №335, от 02.08.16 года №748, от 29.05.17 года №650, а автор этой работы несомненно заслуживает присуждение искомой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». Спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Так, Александр Игоревич, пожалуйста, вопросы в отзыве Александра Павловича прозвучали. Вопросы и замечания. Ответьте на них, пожалуйста.

Соискатель, А.И. Костюк:

Да, давайте пойдём по некоторому порядку. И начнём с бимолекулярных кинетических констант, коэффициентов диффузии и ориентационного фактора. Это действительно ценное замечание, и мне оно до этого, к сожалению, не приходило в голову. Возможно, потому что, когда я читал литературу по этой теме – это в основном классические работы Паттисона и Дэвиса – то они этот вопрос никак не затрагивали, и другие исследования, которые, к сожалению, ну... уже их меньше, гораздо... они тоже этого вопроса, увы, не касаются. Но мы сейчас продолжаем сотрудничать с нашими бельгийскими коллегами, с которыми, собственно, мы кинетику как раз и делали. И есть идеи по поводу, ну, каких-то таких больших обзорных работ по сравнению кинетических параметров и изучению детальному разных сенсоров – не только Нурocrates, но и, может быть, сенсоров семейства НуPer. И мы, наверное, подумаем над тем, чтобы уже в этих публикациях рассмотреть эти вопросы. Далее по поводу констант и знака “~”. Это было некоторое стилистическое решение, которое, может быть... не все с ним согласны... которое, ну, лично мне казалось, что оно облегчает читаемость текста. Потому что мне самому обычно тяжело читать текст, в котором очень большое количество доверительных интервалов, начинаешь в этом плыть. И я посчитал, когда писал литературный обзор, что, наверное, так это несколько увеличит его читаемость. Далее по поводу «краски» и «красителя». Я совершенно согласен с этим замечанием. Текст работы, как Александр Павлович заметил, очень большой, и, ну, тяжело вычитать большой текст – и сохранились некоторые жаргонизмы, англицизмы, опять же – «барьерные фильтры». Вот, мне остается надеяться только на то, что это не сильно осложняет читаемость работы. Но, конечно, я согласен, что нужно, видимо, лучше за этим следить. По поводу опечатки с осью – действительно, неприятная опечатка. И, наконец, по поводу соответствия Cys355 сенсора Cys106 транскрипционного фактора – тут я с оппонентом могу согласиться отчасти, потому что в диссертации эта информация, все-таки, в явном виде приведена на 142 странице, когда я обсуждаю, ну, финальную отобранную версию. Возможно, действительно ее имело смысл еще раз повторить, например, в разделе про рентгеноструктурный анализ, потому что, возможно, эта информация забывается к этому моменту. И в автореферате, действительно я, к сожалению, это не указал в явном виде, и это мой просчет. Я согласен, что это ухудшает, видимо, читаемость автореферата. Вот, мне кажется, я ответил.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Александр Павлович, вас удовлетворили ответы на замечания?

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:

Полностью!

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Так, слово предоставляется оппоненту Алексею Викторовичу Соколову.

Официальный оппонент, д.б.н., А.В. Соколов:

(излагает отзыв, отзыв прилагается, отзыв положительный)

Глубокоуважаемые коллеги, мне очень приятно... для меня честь – оппонировать эту работу. И я был просто в восторге от этой работы, признаюсь честно, без всякой... лести или лжи. Работа читается очень легко, приятно. Далек не первая работа, которую я оппонировать, но одна из первых, которые я оппонировать именно как специалист по пероксидазам млекопитающих, гем-содержащим. С одной стороны, как редактор научного журнала, я был удивлен, что я, несмотря на наличие целого ряда жаргонизмов, не нашел практически ни одной опечатки. Ни одной опечатки! Бог с ними там, со всякими жаргонами, но опечаток нет. Это было для меня просто удивительно. Нередко сталкиваешься с тем, что в диссертации в литературном обзоре нет ни одной

иллюстрации. Вот как бы ни одного рисунка. А в данной диссертации – прекрасно оформленные иллюстрации, в едином стиле, и ты просто получаешь эстетическое наслаждение, и понимаешь, что это не просто взяты рисунки с чьих-то обзоров или статей, а человек сам очень вдумчиво проработал их, нарисовал, оформил так, что просто глаз радуется. И для меня это было, опять же, наслаждением... как оппонента. Я позволю себе опустить всяческие формальные моменты, потому что, ну, они в отзыве есть, они изложены казённым языком, мне бы хотелось, все-таки, поговорить от души об этой работе. В литературном обзоре единственное, вот, что немножко так выпало – это роль пероксидазина. Это относительно недавно обнаруженная пероксидаза млекопитающих, и у нее немножко не иммунные функции, а она, вот, например, обеспечивает формирование базальной мембраны. Обеспечивает, ни много, ни мало, перешиву коллагена IV типа. Опять же, с помощью образования сульфенамидной связи. И к ней сейчас пристальное внимание, потому что оказалось, что меланома, например, чем более она агрессивна – тем выше у нее экспрессия вот этого фермента. Мне кажется, что в области онкологии эта работа, возможно, даст немало полезного, вот, именно применительно к этому ферменту. Вот, литературный обзор просто привел меня в восторг. Что касается методической части, тут, конечно, я, опять же, ну, нашел все мои любимые методы. Все прекрасно по части и генетических методов, и, собственно, создание конструкций описано хорошо, и регистрация активных форм галогенов – все это сделано на очень высоком уровне. Заканчивается все это нашими любимыми нейтрофилами, которые довольно, вообще-то, капризные клетки. Но их сумели выделить в интактном виде, скормить их... им бактерии. До этого я в зарубежных работах видел, как скормливают нейтрофилам бактерии просто с зеленым флуоресцентным белком и видят, как он гаснет. И этого было, в общем-то, им достаточно. А здесь белок зажигается – и это очень красиво и наглядно. И все это заканчивается, как вы знаете, мальками *Danio rerio*, где все очень красиво сделано. Действительно, это работа, про которую можно сказать – «впервые в мире получен вот такой сенсор генетически кодируемый». Проблема ведь еще в том, что сенсоров-то химического типа огромное количество. Просто, ну, каждый год минимум 15 работ выходят, которые обещают вам, что с помощью вот такой-то химической структуры, вы зарегистрируете хлорноватистую кислоту, бромноватистую кислоту. Вот, кстати, псевдотиоциановую... гипотиоциановую – никто не обещает. Вот никто ни разу не создал химической структуры, которая бы отвечала. Но беда в том, что как только вы приходите... Вы понимаете, что вы это вещество никогда не купите – оно просто еще... как бы, ни в каком каталоге его нет. Если вы приходите к химикам, то они смотрят в сапплементари на синтез и говорят – ты знаешь, я это никогда не воспроизведу. Тут все так написано – вроде, оно должно получаться, но я знаю, что вот это так не идет, это так не идет. Мы этого с тобой никогда не получим. Вот. А прелесть генетически кодируемого сенсора, что я могу взять эту последовательность, и я гарантированно знаю, что я получу этот продукт, и он будет у меня работать. Это просто замечательно, на мой взгляд. Результаты очень, как бы, хорошо, грамотно, ну, как бы, несмотря на весь жаргон, описаны. Прекрасно обсуждены. Вот, как бы, картинки вызывают просто эстетическое, опять же, наслаждение. Выводы абсолютно соответствуют тому, что было заявлено. И вызывают, в общем-то, восхищение. Вот. Но немножко, как бы, я вынужден... А, еще хочу отметить такой момент, который как-то тут не прозвучал, но, как бы, для меня он кажется важным, что вообще-то, как бы, журналы, в которых опубликованы результаты исследования – это, вообще-то, самые престижные... Вот, по крайней мере, для редокс-биолога опубликовать результаты кандидатской в *Free Radical Biology and Medicine*... Ну, мы обычно дни приема статей в эти журналы, мы их вот просто отмечаем. Потому что для нас это – достижение. Тут, ни много ни мало, *Nature Communications* с импакт-фактором 17.7, *Free Radical Biology and Medicine* – 8.1, *Antioxidants* – 7.6 и *International Journal of Molecular Medicine* – 2 статьи, импакт-фактор 6.2. Ну, можно критиковать вот эту

наукометрию, но, на мой взгляд, это высшая оценка просто научного общества. И я закругляюсь уже, перехожу...

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Это абсолютно правильно, я считаю. Это объективный показатель. Извините.

Официальный оппонент, д.б.н., А.В. Соколов:

Так, и я вынужден, значит, подлить небольшую, все-таки, ложку дегтя. Я зачитаю вопросы. Значит, в диссертационной работе были использованы термины «гипогалогенные» (стресс и, соответственно, кислоты) вместо терминов «галогенирующий» и «гипогалоидные кислоты» из русскоязычного обзора моего коллеги, и я, собственно, его соавтор... Панасенко Олег Михайлович, 13-ого года, который цитируется в англоязычном варианте – ссылка под номером 637, ни много ни мало. Практически во всех реакциях с биополимерами участвует именно молекулярная форма хлорноватистой кислоты, а не гипохлорит. Существу... Существенная часть НОС1, генерируемая в нейтрофилах, реагируя с таурином, превращается в N-хлорамин таурина, и тут уже никакого «гипо» нет. Вот, на мой взгляд, это не вполне соответствует термину «гипогалогенный». Я бы хотел узнать, собственно, чем руководствовался диссертант при выборе именно вот этого термина? Второй вопрос – какие выходы биосенсора в микрограммах с чашки Петри или миллиграммах с литра LB среды были получены при экспрессии с помощью, вот, собственно, описанного метода? Выявлены преимущества для экспрессии и очистки биосенсора у одного из штаммов? Соответственно, был использован Shuffle и XL1-Blue. Третий вопрос – под контролем какого промотора был экспрессирован Nurocrates при трансфекции клеток HeLa Kyoto? Возможна ли количественная оценка продукции активных форм галогенов или псевдогалогенов нейтрофилами в наномолях оксиданта на клетку? И четвертый вопрос – проводилась ли оценка токсичности и иммуногенности белкового биосенсора при экспрессии в клетках или мальках *Danio rerio*? Данные вопросы, тем не менее, носят дискуссионный характер и ни в коей мере не преуменьшают... вот эту пионерскую работу и достижения диссертанта. И я зачитаю вот эту вот формулировку, которую требует ВАК. 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, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне, практической значимости полученных результатов настоящая работа полностью соответствует пункту 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24-ого сентября 23-ого года №842... ну, и далее уточнения я не буду зачитывать... предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Костюк Александр Сергеевич... извините, Игоревич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Александр Игоревич, пожалуйста, ответьте на вопросы Алексея Викторовича.

Соискатель, А.И. Костюк:

Буду отвечать на них по порядку. Сначала вопрос по поводу терминологии. Значит, «галогенирующий стресс» и «гипогалоидные кислоты». Я разделю ответ на этот вопрос на две части. Сначала по поводу кислот. В корпусе русскоязычных текстов я находил три

варианта – «гипогалогенные кислоты», «гипогалоидные», и кто-то даже пишет «гипогалогеновые кислоты». Последний вариант встречается достаточно редко, а у первых двух вариантов встречаемость примерно похожая, поэтому мне кажется, что это вопрос вкуса. Что касается термина «галогенирующий стресс», то тут я после раздумий вынужден скорее согласиться с оппонентом, и поясню, какой логикой руководствовался я, когда выбирал термин «гипогалогенный стресс». Когда я выбирал данный термин, я имел в виду, что изначально существуют гемовые пероксидазы, у них есть каталитическая активность, и они производят гипогалогенные кислоты. И, соответственно, в дальнейшем, поскольку эти кислоты крайне реакционноспособны, они вступают во множество реакций, и я, ну, как бы посчитал, что вот – тот остальной спектр реакций – он начинается с гипогалогенного стресса. Но, наверное, термин «галогенирующий стресс» – действительно более общий и в то же самое время более четкий, и, наверное, в будущем, я думаю, что я буду переключаться на использование этого термина. Дальше по поводу выходов биосенсора, технический вопрос. Если говорить о выходах с чашек Петри, то нам удастся в хороших условиях достичь примерно миллиграмма с чашки. Если говорить о жидкой среде, то с литра нам удастся, опять же, при хорошем выходе достичь 70 миллиграммов. Если говорить о сравнении штаммов, то какой-то существенной разницы не было найдено. Дальше по поводу промотора при трансфекции HeLa Kyoto. Мы использовали PCS2 вектор, который несет просто CMV промотор. Наша задача была добиться некоего, ну, достаточно выраженного уровня экспрессии, чтобы мы могли проверить, что сенсор нормально фолдится, что он отвечает, восстанавливается – поэтому мы не преследовали, ну, каких-то целей более сложных, и у нас не было нужды в каких-то специфических промоторах. И дальше, на самом деле, очень интересный вопрос, он пересекается с вопросом ведущей организации – по поводу количественной характеристики продукции активных форм (псевдо)галогенов нейтрофилами в наномолях оксиданта на клетку. Ох... Тут надо понять, о какой системе мы говорим. Если мы говорим об условиях *in vitro*, то мой ответ будет – да, возможно. Потому что сенсор хорошо охарактеризован как раз *in vitro*, мы знаем, как изменяется его спектр при окислении, и мы можем, ну, то есть, четко понимать, что если спектр изменился вот на столько, то значит – получилось в системе, возникло столько-то активных форм (псевдо)галогенов. Поэтому можно что сделать – можно взять нейтрофилы, поместить в буфер, в буфере просто развести выделенный препарат сенсора, и дальше в кювете смотреть оптически, что происходит в системе, и дальше, да, посмотреть – что вот сигнал сенсора за час изменился на столько-то, значит мы пересчитываем... мы знаем его концентрацию... столько-то синтезировалось. Ну, и на клетку получается, опять же, такое количество. Когда мы переходим к тому, что происходит в тканях – то тут все становится сильно сложнее, потому что, ну, не всегда удастся установить концентрацию белка в клетках. И поэтому если смотреть на корпус статей про генетически кодируемые сенсоры, то в таких системах... ну, либо в сложных клеточных структурах... культурах, либо в системах *in vivo*, сенсоры считают полуколичественным инструментом. Лучшее, что здесь можно предложить – из того, что я видел в свежих публикациях – это, когда люди берут фрагменты тканей и некоторые из них полностью восстанавливают, некоторые из них целевым анализом полностью окисляют – и тем самым, получается, устанавливают размах максимальный ответа. И дальше все кривые, которые они потом регистрируют, они пересчитывают как процент окисленного сенсора. Вот. То есть, это лучшее, что можно предложить. Но тем не менее, эти кривые можно сравнивать друг с другом, применять статистические методы, но, конечно, в молях это, увы, не будет. *In vitro* – можно. И последний вопрос – про токсичность и иммуногенность. До иммуногенности у нас руки пока не дошли. А что касается токсичности, то мы ее напрямую не измеряли, но тут ситуация в следующем – что у нашей группы, в принципе, большой опыт работы с сенсорами. И мы не замечали каких-то прям существенных отличий, допустим, мальков, экспрессирующих Nurocrates, от мальков, экспрессирующих сенсоры семейства NurPer,

или от нормальных мальков. Сейчас... Вот то, что было представлено в работе, – это временная экспрессия, это мРНК. Сейчас у нас коллеги мои получают трансгенов с Nurocrates, и эти рыбы, они развиваются, размножаются, конечно, там, как обычно, какой-то процент уродства есть, но он всегда при таких манипуляциях есть. Но там, как бы, нет чего-то такого, что бы нас, по крайней мере, сподвигло действительно начать изучать его токсичность. Потому что бывают прям токсичные сенсоры, но это, как правило, видно уже на стадии клеточной культуры эукариотической. Они могут либо агрегировать и вызывать гибель клеток... Вот. Ну, как-то вот так.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:
Алексей Викторович, вы удовлетворены ответами?

Официальный оппонент, д.б.н., А.В. Соколов:
Да.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:
Все, спасибо. Так. Уважаемые коллеги, тогда мы переходим к публичной дискуссии. Кто хотел бы высказаться, выступить по результатам доложенным, по обсуждению, по вопросам, по замечаниям? Пожалуйста. Хотя, уже и так мы очень много тут, я считаю, обсудили, и очень было интересно, на мой взгляд. Ну, не вижу желающих...

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:
Я два слова...

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:
Пожалуйста, Владимир Александрович.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:
Да. Я хочу... Ну, во-первых, конечно, работа замечательная. Пионерская, действительно, это новое. Но это такая тематика – вот эти сенсоры. По-моему, она такая бездонная. То есть, будут находить все новые и новые мишени, и потребуются все новые и новые сенсоры. Но то, что вот сейчас сделано, это – конечно, совершенно фантастика. Вот. Обязательно я хочу сказать еще два слова просто об Александре. Я там был неоднократно на семинарах, которые проводятся. И, вот, просто как личность, как ученый... Мне очень понравилась его компетентность, его активность, его энтузиазм в обсуждении. То есть, выше всяких похвал. То есть, конечно, я призываю голосовать за присуждение степени, потому что это в общем-то полностью сложившийся очень интересный и яркий ученый.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:
Спасибо, Владимир Александрович. Коллеги. Да. Пожалуйста. Александр Павлович, да.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:
Я уже не в порядке оппонирования...

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:
К микрофону, пожалуйста. Да, да, да. Оппоненты тоже имеют право участвовать в дискуссии. Более того, приглашаются.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий:
Я уже высказал свое мнение по поводу диссертации и диссертанта. Просто возникла дискуссия... С цветными белками много вопросов, на самом деле, намного больше, чем обычно думают, по поводу иммуногенности. Могу ответить. У меня сейчас идет такой

проект – все белки цветные иммуногенны, но точно так же, как люди существуют очень часто с аутоиммунными заболеваниями, в общем-то... Но есть способы преодолеть эту иммуногенность. Вот. Она преодолевается. Если нужно сделать специальные не-иммунные цветные белки – это решаемая задача. Вот. Поэтому... Поскольку возникла неожиданно эта дискуссия, я решил дополнить, чтобы было понятно. Это никак не ограничивает применимость такого рода сенсоров.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо большое. Так. Ну, на этом мы заканчиваем процедуру. Заканчиваем дискуссию. Пожалуйста, Александр Игоревич, вам – заключительное слово есть возможность сказать.

Соискатель, А.И. Костюк:

В первую очередь я хотел бы поблагодарить моего научного руководителя, Дмитрия Сергеевича Билана, за все те годы, которые мы работаем вместе, потому что я чувствую, что это... ну, как мне кажется, субъективно... вот я слушаю, что говорят люди вокруг, там, про свою работу, про свою науку... мне кажется, что это один из лучших выборов, которые я мог сделать. Вот. И я особенно хочу поблагодарить Дмитрия за то, что в те моменты, когда мне казалось, что все достаточно грустно, такие моменты были... Дмитрий очень много учил меня оптимизму. Это, наверное... ну, понятно, что можно много говорить о том, чему Дмитрий меня научил в плане науки, в плане организационной деятельности. Но вот именно с личностной какой-то точки зрения, вот, это то, что было для меня очень важно. То есть, я действительно научился смотреть на многие вещи сильно легче. Также я благодарен Всеволоду Вадимовичу Белоусову. Потому что именно он в 2017 году так или иначе предложил мне заняться этим проектом, и на тот момент он создал условия для того, чтобы я мог этим проектом заниматься. Также я хочу поблагодарить, естественно, весь коллектив Отдела метаболизма и редокс-биологии. Замечательные коллеги, прекрасные люди. И особенно... ну, я мог бы про каждого сказать... но я особенно хотел выделить Анастасию Панову, Романа Раевского и Анастасию Сергееву, которые мне помогали при выполнении ряда экспериментальных процедур. Я также хотел бы поблагодарить одной фразой Кафедру биохимии Биологического факультета МГУ. Это то место, где мой научный путь начался, и многие вещи, которыми я до сих пор пользуюсь, это те вещи, которым меня научили там. Я очень благодарен моим оппонентам за внимательное прочтение работы и все комментарии. Я надеюсь, что сейчас после формальных процедур у нас будет возможность еще поговорить на эту тему. И, как в конце, на мой взгляд, правильно сказать – большое спасибо моим друзьям. Многие из них присутствуют сейчас в зале. Кто-то, к сожалению, не может присутствовать. Последние пара лет для меня были достаточно сложными, и это те люди, благодаря которым я сохранил здравый рассудок. Вот. Как-то так. Ну, и конечно спасибо моим родителям, которые меня... хоть они и далеки от науки... поддерживают на каждом пути. Все.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Спасибо. Так, уважаемые коллеги. Да, если нет у членов диссертационного совета... да, бурные аплодисменты... замечаний, вопросов по проведенным процедурам, мы приступаем к тайному голосованию. Состав счетной комиссии был озвучен. Пожалуйста.

(Проходит тайное голосование)

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Да, уважаемые коллеги, пока работает счетная комиссия, просьба ознакомиться с проектом заключения по диссертации. Спасибо, коллеги. Есть у кого-то вопросы,

комментарии, замечания? Не вижу. Так, счетная комиссия, я вижу, готова огласить результаты тайного голосования. Владимир Александрович, пожалуйста.

(Далее оглашаются результаты работы счетной комиссии)

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Счетная комиссия завершила свою работу. Костюк Александр Игоревич. Присутствовало на заседании 20 членов совета, роздано бюллетеней – 20, оказалось в урне – 20, «за» – 20, «против» и «недействительных» – нет.

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

Уважаемые члены совета, предлагается утвердить результаты открытым голосованием. Кто за то, чтобы утвердить эти результаты? Против? Нет. Воздержались? Нет. Принято единогласно. Предлагается утвердить заключение. *(Проходит голосование по проекту заключения диссертационного совета)* Против – нет. Воздержались – нет. Принято единогласно. *(Проект заключения принимается единогласно)*. На этом мы заканчиваем работу нашего диссертационного совета. Спасибо...

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Ну, осталось только поздравить наших...

Зам. председателя, д.ф.-м.н., Р.Г. Ефремов:

И поздравляем, конечно, наших соискателей. наших кандидатов наук.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников:

Поздравляем. Вот, теперь можно аплодировать!

Зам. председателя
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь
д.ф.-м.н.

Олейников Владимир Александрович

