

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Терехова Станислава Сергеевича «Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности»**, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия

Разработка новых высокопроизводительных методов, позволяющих выявлять вариации конформаций молекулярных мишеней, доступных для специфического воздействия лекарственных препаратов, а также осуществлять направленный поиск новых биологически активных соединений, является важной научной задачей, обусловленной необходимостью создания новых более эффективных лекарственных соединений и способов их применения на клеточном уровне. Поэтому диссертационная работа С.С. Терехова, посвященная разработке и демонстрации возможностей применения микрофлюидных технологий для высокопроизводительного массивного скрининга вариаций функциональной активности молекулярных структур в составе единичных клеток, представляется весьма актуальной.

Диссертация оформлена в традиционной манере и включает оглавление, список сокращений и введение, за которым следует обзор литературы, включающий описание микрофлюидных технологий, позволяющих создавать идентичные по размеру микросферы, с инкапсулированными живыми клетками. Далее следует детальное описание материалов, использованных методов, а также разработанных автором оригинальных технологических процедур, включая создание микрофлюидного устройства для генерации водорастворимых микросфер, ограниченных липидной оболочкой и содержащих единичные клетки и репортерные реагенты, способные генерировать оптический сигнал, в зависимости от статуса тестируемых особенностей жизнедеятельности клеток. Наконец, третий раздел – собственно результаты и обсуждение, затем выводы, список литературы, насчитывающий 237 наименований, а также приложение с описанием отдельных реагентов и методических этапов работы. В целом оформление диссертации соответствует требованиям, установленным ВАК РФ.

Главный раздел диссертации «Результаты и обсуждение» состоит из пяти подразделов, описывающих основные составляющие работы. Однако, исходя из значимости представленных результатов, следует, прежде всего, отметить важнейшую базовую часть диссертации, помещенную в раздел «Материалы и методы» и

описывающую конструкцию и этапы создания микрофлюидных чипов, входящих в состав автоматизированных микроустройств, способных генерировать в секунду до 25000 водорастворимых микросфер, ограниченных липидной оболочкой размером 60 и 20 микрон. Именно, возможности применения клеточного сортера для высокоскоростного анализа колоссального множества микрообъектов, заключенных в относительно малом объеме образца микросфер, и позволяет говорить о «Микрофлюидной платформе для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антимикробной активности».

В первой части раздела «результаты и обсуждение» автор описывает «микрофлюидную платформу», которая представлена системой процедур «для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии» или, иначе говоря, в водорастворимых липидных микросферах, содержащих клетки и растворы реагентов. Вторая часть раздела результатов демонстрирует примеры скрининга биокаталитической активности клеток, заключенных в такие микросферы. Продемонстрированы процедуры обогащения и отбора клеток, обладающих целевой биокаталитической активностью, а также возможности селекции различных типов или различных уровней активности.

Третья часть раздела «результаты и обсуждение» посвящена селекции и анализу структурных вариаций мутантов рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека, устойчивых к действию фосфорорганических токсинов. Показано, что ряд полученных мутантов бутирилхолинэстеразы обладает каталитической активностью, обуславливающей гидролиз фосфорорганических токсинов. Четвертая часть раздела результатов посвящена созданию продуцентов и изучению фармакологических характеристик тетрамера рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека. Представлены убедительные экспериментальные доказательства того, что тетрамерная форма этого фермента обладает на три порядка улучшенными фармакологическими характеристиками, по сравнению с мономерными и димерными формами.

Особенный интерес представляет последняя часть раздела результатов, посвященная разработке и применению метода изучения взаимодействия пары бактериальных микроорганизмов, заключенных внутри микросфер при поддержании условий, способствующих их культивации. Используя репортерные системы на основе зеленого флуоресцентного белка, продуцируемого штаммом *Staphylococcus aureus*, и на основе флуоресцирующих в красной области вторичных метаболитов (продигнинов) штамма

Streptomyces venezuelae, была продемонстрирована возможность количественной регистрации подавления стафилококков стрептококками.

Разработанная в ходе модельных экспериментов система была далее адаптирована автором для поиска микроорганизмов ротовой полости, продуцирующих ингибиторы роста золотистого стафилококка. Был выявлен ряд микроорганизмов, обладающих искомой активностью, из которых наибольшую эффективность демонстрировали *Streptococcus oralis* и штамм *Pseudomonas aeruginosa*, полностью ингибировавший рост стафилококка в культуре даже при попадании единичных клеток *P. aeruginosa* (синегнойной палочки). Хотя синегнойная палочка и не является нормальным компонентом микрофлоры ротовой полости, автора заинтересовали ее метаболиты, способные эффективно ингибировать рост золотистого стафилококка. Было установлено с привлечением методов масс-спектрометрии, что таковыми метаболитами являются пиоцианин, феназин-1-карбоновая кислота и 2-гептил-4-гидроксихинолин N-оксид.

Таким образом, результаты диссертационной работы С.С. Терехова открывают новые уникальные возможности для осуществления направленной эволюции ферментов с целью создания новых биокатализаторов с заданными свойствами, а также для выявления перспективных прототипов новых соединений, обладающих антимикробной активностью, что особенно важно ввиду растущей устойчивости биопатогенов к современным лекарственным препаратам.

Все выше сказанное позволяет квалифицировать диссертационную работу С.С. Терехова, как новое крупное научное достижение, вносящее существенный вклад в развитие молекулярно-биологических скрининговых методов исследования и имеющее большое значение для различных практических приложений.

На фоне высокой оценки результатов работы С.С. Терехова, нельзя не высказать несколько замечаний. Так, создание микрофлюидной установки для генерации монодисперсных микросфер с инкорпорированными реагентами и клетками является основой диссертации, обеспечившее успех всей работы. Однако, разработанная установка и ее устройство представлены лишь схемами, никак не покрывающими полноту технического описания. Странно также, что факт создания такой установки не внесен отдельным пунктом в раздел «Выводы». В разделе «Выводы» диссертации отсутствует нумерация отдельных пунктов, хотя в автореферате такая нумерация имеется. Желательно также, чтобы названия родов микроорганизмов, начинающиеся с одинаковой буквы, например *Staphylococcus* и *Streptomyces*, печатались бы полностью без сокращений.

Указанные выше замечание имеют преимущественно дискуссионный характер и не снижают ценности представленной диссертации.

В целом, диссертационная работа С.С. Терехова очень хорошо оформлена и изложена, имеет внутреннее единство и демонстрирует эффективный вклад автора в развиваемое им научное направление. Работа является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы С.С. Терехова представляют собой яркое научное достижение, открывающее новые методические возможности молекулярно-биологических исследований и практических приложений в биомедицине. Результаты опубликованы в ведущих отечественных и зарубежных журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

Автореферат соответствует содержанию диссертации. В нем адекватно отражены основные идеи и выводы диссертации, показаны вклад автора в проведенное исследование, степень новизны и практическая значимость полученных результатов.

Все выше изложенное позволяет заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения, научной и практической значимости диссертационная работа Терехова Станислава Сергеевича «Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности» соответствует требованиям, изложенным в п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Главный научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
доктор физико-математических наук,
профессор



А.С. Заседателев

18 ноября 2016 г.

Подпись А.С. Заседателева удостоверяю.
Ученый секретарь Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН,
кандидат ветеринарных наук



А.А. Бочаров