

Федеральное агентство научных организаций
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИНЦ РАН)**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812)297-35-41,
эл. адрес: cellbio@incras.ru; <http://www.cytspb.rssi.ru/>

25.11.2016 № 12316-662-319

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО директора



Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт цитологии РАН
д.б.н. Михайлова Наталья Аркадьевна

ноября 2016г

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук на диссертационную работу **Терехова Станислава Сергеевича** «Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности», представленную к защите в диссертационный Совет по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 501.001.41 при ФГОУВПО Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Актуальность темы диссертационной работы

Скрининг комбинаторных химических библиотек в настоящее время является одним из наиболее эффективных подходов к созданию новых фармацевтических препаратов. Использование новых подходов скрининга библиотек, основанных на использовании микрофлюидных технологий, позволяет не только снизить затраты на проведение процедуры скрининга, но и значительно увеличить производительность. Микрофлюидные технологии открывают новые уникальные возможности высокочувствительного и высокопроизводительного скрининга клеточных библиотек. Новые высокопроизводительные методы скрининга биокаталитической активности позволяют осуществлять направленную эволюцию ферментов с целью создания биокатализаторов с заданными свойствами. Поиск новых антимикробных препаратов также представляет высокий интерес ввиду возникновения штаммов патогенов, устойчивых к действию всех известных в настоящее время антибиотиков. Таким образом, актуальность темы представленной диссертационной работы не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования, достоверность и обоснованность научных результатов

Направленная эволюция ферментов особенно актуальна для создания новых терапевтических биокатализаторов на основе рекомбинантного фермента бутирилхолинэстеразы человека (рчБуХЭ), способных инактивировать фосфорорганические токсины (ФОТ). В этом плане особый интерес представляют молекулярно-биологические процессы тетрамеризации рчБуХЭ, как способ получения препарата с улучшенными фармакокинетическими свойствами без использования дополнительных стадий химической модификации и очистки.

Еще одним направлением работ стало создание платформ для поиска бактерий, ингибирующих рост патогена золотистого стафилококка, в котором используется широкомасштабное секвенирование и которое позволяет заменить классические методы скрининга.

Диссертация построена по традиционному плану, она изложена на 163 стр. (включая Приложения) машинописного текста, иллюстрирована 57 рисунками и 4 таблицами и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждения, Выводы, Список литературы и Приложения. Библиографический указатель включает 237 цитированных работ.

Обзор литературы отражает современное состояние научных знаний в этой области и состоит из 5 частей: (1) характеристики классических методов ультравысокопроизводительного скрининга; (2) и (3) анализа преимуществ микрофлюидных технологий компартиментализации и скрининга; (4) характеристика рчБуХЭ в качестве антитода при отравлении ФОТ и (5) описания новых подходов к скринингу антибиотической активности. Обзор написан емко и немногословно; некоторые замечания к его тексту имеются в конце Отзыва.

Глава **Материалы и методы** очень велика и составляет по объему около четверти диссертации. В ней детально изложены методы, в том числе выращивание бактериальных, дрожжевых и животных клеток (вплоть до состава сред), получение плазмид, создание библиотек мутантов, методы работы с белками и многое другое. Надо отметить, что масштаб работ и набор методов впечатляют, особенно с учетом того, что первые результаты стали публиковаться автором всего лишь два года назад.

Глава **Результаты и обсуждение** состоит из 5 основных частей. В первой части работы описано устройство микрофлюидной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Течение жидкостей в микрофлюидных чипах находилось под управлением пневмо-пьезоэлектрической установки, что приводило к генерации монодисперсной двойной эмульсии с

использованием метода последовательной эмульсификации в микрофлюидных чипах. Собственно, эта система и является основным успехом разработки и самого автора. Вторая часть работы посвящена проведению скрининга биокаталитической активности в каплях двойной эмульсии. Было показано эффективное обогащение клеток, обладающих целевой биокаталитической активностью из смеси активных и неактивных клеток, смеси клеток с различным типом биокаталитической активности, а также клеток с различным уровнем ферментативной активности одного типа. Третья часть посвящена отбору вариантов рчБуХЭ, обладающих новой биокаталитической активностью. Были отобраны мутанты рчБуХЭ (cl 14, cl 15 и cl 19), устойчивые к действию ФОТ, в том числе благодаря возникновению параоксоназной активности, искусственно созданной в процессе направленного мутагенеза ацил-связывающей петли молекулы рчБуХЭ. Четвертая часть посвящена улучшению фармакокинетических характеристик рчБуХЭ за счет ее продукции исключительно в виде тетрамера. Предложенный в работе альтернативный подход к экспрессии рчБуХЭ, основанный на тетрамеризации *in vivo*, привел к получению чисто олигомерной рчБуХЭ (4рчБуХЭ), обладающей улучшенными фармакокинетическими характеристиками. Период полувыведения препарата 4рчБуХЭ был более чем в 10 раз выше, чем у препарата рчБуХЭ, что позволило использовать его для профилактики отравления ФОТ. Оптимизированная форма 4рчБуХЭ обладала низким уровнем накопления в органах, и метаболизм в печени проходил с образованием низкомолекулярных продуктов, которые выводились почками. Эта часть работы производит особо положительное впечатление, поскольку в ней методологические изыски, примененные автором, сопровождаются успешными результатами.

Пятая часть посвящена скринингу антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Наиболее значимым фактом является то, что микрокомпарменты биосовместимой двойной эмульсии могут быть использованы для кокультивации микроорганизмов. С использованием модельной системы, бактерии-жертвы, убийцы и сожители, исследована эффективность негативной селекции, и было показано, что подходы скрининга, основанного исключительно на негативной селекции, имеют ограниченную эффективность и требуют наличия дополнительных позитивных сигналов-репортеров. Усовершенствованная технология скрининга была использована для идентификации бактерий микробиоты ротовой полости, подавлявших рост патогена *S. aureus*, и установлено, что наиболее распространенными бактериями, ингибирующими *S. aureus* в ротовой полости, являлись *S. oralis*. В то же время было показано эффективное ингибирование *S. aureus* медленно растущими *Propionibacterium acnes*, что доказать ранее с использованием классических методов скрининга было невозможно. В серии элегантных

экспериментов были отобраны *P. aeruginosa*, которые демонстрировали полное подавление роста *S. aureus* при ко-культивировании. Эта часть работы также отлично иллюстрирует возможности технологий, развитых автором.

При детальном изучении диссертации, в основном главы Результаты и обсуждение, возникает несколько вопросов и замечаний.

1. В результатах не указано, каково реальное количество капель микрофлюидной двойной эмульсии, подвергавшихся скринингу в каждом конкретном эксперименте.
2. Не приведены экспериментальные подтверждения того факта, что при инкапсуляции клеток заполнение капель клетками происходит в соответствии с распределением Пуассона.
3. Отсутствует объяснение причин возникновения самореактивации у отобранных мутантов БУХЭ cl 14 и 15.
4. Не приведено экспериментальных свидетельств в пользу того, способен ли ингибитор CBDP ингибировать БУХЭ мыши и вводимый препарат 4рчБУХЭ.
5. Выводы из работы недостаточно структурированы, отсутствует нумерация.

Выводы соответствуют поставленным задачам. Автореферат отражает основное содержание работы.

Сделанные замечания не принципиальны и не снижают общую положительную оценку диссертации. Автор демонстрирует высокую квалификацию и прекрасное владение материалом.

Значимость диссертации для науки и практики

Диссертация Терехова Станислава Сергеевича «Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности» выполнена на высоком методическом уровне и в целом является завершенным фундаментальным исследованием в области биоорганической химии, которое содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития новых методов масштабного скрининга биокатализаторов и полезных штаммов микроорганизмов. В работе показано, что разработанная микрофлюидная платформа может быть использована для ультравысокопроизводительного скрининга индивидуальных клеточных активностей (биокаталитической и антимикробной) среди высокого фенотипического разнообразия микроорганизмов, обладающих представительностью более 10^7 вариантов. Преимущества микрофлюидной платформы были использованы для направленной эволюции бутирилхолинэстеразы и позволили создать искусственную каталитическую активность, связанную с гидролизом ФОТ. Использование микрофлюидных технологий для изучения бактериальных взаимодействий

позволяет проводить анализ значительно большего биологического разнообразия, чем это возможно с использованием классических микробиологических методов. В свою очередь, это позволило идентифицировать редкие (*P. aeruginosa*) и трудно культивируемые (*P. acnes*) представители микробиоты ротовой полости, ингибирующие рост патогенных бактерий *S. aureus*. Метаболомный анализ отобранного штамма *P. aeruginosa* показал, что его ингибирующие свойства связаны с продукцией вторичных метаболитов, направленных на индукцию окислительного стресса.

Данные, полученные автором, докладывались на российских и международных конференциях, полностью опубликованы в рецензируемых научных журналах и могут быть использованы научными группами ряда ведущих институтов РАН – Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н.Баха РАН, Институте белка РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН и др., для биомедицинских исследований, направленных, на поиск и разработку новых биокатализаторов.

Работа полностью соответствует требованиям ВАК, изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 г., а сам автор, безусловно, достоин присуждения ему искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Отзыв на диссертационную работу Терехова Станислава Сергеевича заслушан и одобрен на заседании Лаборатории защитных механизмов клетки и Отдела клеточных культур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН 9 ноября 2016 года, протокол №5.

И.о. Заведующего Отделом клеточных культур
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института цитологии РАН,
доктор биологических наук
194064 Санкт-Петербург,
Тихорецкий пр., 4
Тел. (812)2973794
e-mail: margulis@incras.ru

Маргулис Б.А.

Подпись Маргулис Б.А. удостоверяю
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН, к.б.н.



Тюреева И.И.

Федеральное агентство научных организаций
(ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

**Институт цитологии
Российской академии наук**
(ИНЦ РАН)

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-03-41

ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу
(Отдел № 3, ИНЦ РАН), л/с 20726Ц41010,
Северо-Западное ГУ Банка России
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

25.11.2016 № 12316-662-319

Ученому секретарю

Диссертационного совета Д 501.001.41
по химическим наукам при Московском
государственном университете им.
М.В.Ломоносова
кандидату химических наук доценту

И.Г.Смирновой

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук направляет **официальный отзыв** в качестве ведущей организации на диссертацию **Терехова** Станислава Сергеевича на тему: «Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям «Биоорганическая химия».

Приложение:

1. Отзыв на 6 стр. - 2 экз.
2. Сведения о ведущей организации (таблица) – 2 экз.
3. Сведения об ИНЦ РАН – 1 экз.
4. Сведения о ВРИО директора ИНЦ РАН Н.А.Михайловой (утвердившей отзыв) – 1 экз.

ВРИО директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Институт цитологии Российской академии наук
доктор биологических наук доцент



Н.А.Михайлова

Федеральное агентство научных организаций
(ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

**Институт цитологии
Российской академии наук**
(ИНЦ РАН)

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-03-41

ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу
(Отдел № 3, ИНЦ РАН), л/с 20726Ц41010,
Северо-Западное ГУ Банка России
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

25.11.2016 № 12316-662-(319)

Ученому секретарю
Диссертационного совета Д 501.001.41
по химическим наукам при Московском
государственном университете
им. М.В.Ломоносова
кандидату химических наук доценту

И.Г.Смирновой

от Михайловой Натальи Аркадьевны

В связи с защитой кандидатской диссертации С.С.Терехова на тему:
«Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с
использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической
и антимикробной активности» **согласна** на включение в аттестационное
дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых на
основании нормативных документов Правительства, Минобрнауки и ВАК; в
том числе на размещение их в сети Интернет на сайте ИМКБ СО РАН, на
сайте ВАК, в единой информационной системе.

ВРИО директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Институт цитологии Российской академии наук
доктор биологических наук по специальности
«Зоология» (03.02.04)

доцент по специальности «Клеточная биология,
цитология, гистология» (03.03.04)



NA
Н.А.Михайлова

Сведения о ведущей организации

по кандидатской диссертации Терехова Станислава Сергеевича на тему «Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ИНЦ РАН
Ведомственная принадлежность	ФАНО
Почтовый индекс, адрес организации	194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	www.cytspb.rssi.ru/
Телефон	+7 (812) 297-18-34
Адрес электронной почты	cellbio@incras.ru; http://www.cytspb.rssi.ru/
Список основных публикаций работников ведущей организации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	<ol style="list-style-type: none"> 1. Abkin SV, Ostroumova OS, Komarova EY, Meshalkina DA, Shevtsov MA, Margulis BA, Guzhova IV. Phloretin increases the anti-tumor efficacy of intratumorally delivered heat-shock protein 70 kDa (HSP70) in a murine model of melanoma. // Cancer Immunol Immunother. 2016 Jan;65(1):83-92. 2. Lazarev VF, Benken KA, Semenyuk PI, Sarantseva SV, Bolshakova OI, Mikhaylova ER, Muronetz VI, Guzhova IV, Margulis BA. GAPDH binders

	<p>as potential drugs for the therapy of polyglutamine diseases: design of a new screening assay. // FEBS Lett. 2015 Feb 27;589(5):581-7.</p> <p>3. Ostroumova OS, Efimova SS, Malev VV. Modifiers of membrane dipole potentials as tools for investigating ion channel formation and functioning. // Int Rev Cell Mol Biol. 2015;315:245-97. doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.12.001.</p> <p>4. Ostroumova OS, Efimova SS, Chulkov EG, Schagina LV. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes. // PLoS One. 2012;7(9):e45135.</p> <p>5. Molecular pharmacology and cell death research in St-Petersburg. Barlev NA, Garabadgiu AV. // Cell Death Differ. 2012 Dec;19(12):2049-50.</p> <p>6. Perspective on multi-target antiplatelet therapies: high content phenotypic screening as an unbiased source of novel polypharmacological strategies. Landré V, Amelio I, Barlev NA, Knight RA, Lisitsa A, Melino G, Antonov AV. // Mini Rev Med Chem. 2015;15(8):622-9. Review.</p>
--	--

Верно

Ученый секретарь ИНЦ РАН

к.б.н. И.И. Тюреева



ПОДПИСЬ

Сведения о ведущей организации

Фамилия, имя, отчество	Маргулис Борис Александрович
Ученая степень и отрасль науки, научные специальности, по которым им защищена диссертация	Доктор биологических наук ИО зав. Отдела клеточных культур 03.00.25 – Гистология, цитология, клеточная биология
Наименование организации, являющееся основным местом работы, должность	ИО зав. Отдела клеточных культур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт Цитологии РАН (ИНЦ РАН)

Верно

Ученый секретарь ИНЦ РАН

к.б.н. И.И. Тюряева



ПОДПИСЬ