

## ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора биологических наук, профессора Владимира Израилевича Муронца на диссертацию Екатерины Сергеевны Шаховой «Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - «Молекулярная биология».**

Диссертация Е.С. Шаховой, безусловно, актуальна. Самое очевидное достижение автора, позволяющее сделать такой вывод, связано с созданием целого набора растений, обладающих биолюминесценцией. Практическая польза от получения таких растений не вызывает сомнений, тем более что в ряде стран «светящиеся» растения уже начали использовать. Однако не менее важны иные аспекты, затронутые в работе, касающиеся как фундаментальных проблем, так и практического применения полученных результатов в разных областях. При этом диссертация Е.С. Шаховой не только актуальна, но и содержит новые результаты, позволяющие достигнуть поставленные цели с использованием оригинальных подходов.

Диссертационная работа Е.С. Шаховой включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы и 7 приложений. Работа изложена на 150 страницах текста и хорошо иллюстрирована 53 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 356 ссылок на русском и английском языках.

Во введении автор хорошо раскрывает актуальность исследования, его новизну и научную значимость.

В обзоре литературы содержится вся необходимая для понимания диссертационной работы информация. Автор подробно рассматривает явления, связанные с изменением цвета, флуоресценции или биолюминесценции, для создания разнообразных репортерных систем. В принципе можно было бы рассмотреть только репортерные системы на основе биолюминесценции, которые исследовал автор. Однако именно предложенная структура обзора литературы позволяет лучше оценить преимущества разных репортерных систем и сделать обсуждение более широким. Особое внимание уделено в обзоре биолюминесцентной системе грибов, которая послужила основой для создания репортерных систем, описанных в экспериментальной части диссертации. Читая обзор, не устаешь удивляться созданным природой разнообразных способов достигать нужного эффекта. Хочется отметить, что обзор написан понятно, хорошим языком и прекрасно иллюстрирован.

Очень хорошее впечатление производит раздел «Материалы и методы», который написан очень подробно со всеми необходимыми деталями. Этот раздел изложен почти на 30

страницах, что указывает как на обилие использованных автором методов, так и на их обстоятельное изложение. Такой раздел важен как для сотрудников лаборатории, так и для других исследователей, которые будут проводить похожие эксперименты. По этому разделу у меня нет никаких замечаний.

Описание результатов, данное в последующих главах, производит благоприятное впечатление, как по сути, так и по форме изложения. Безусловно, основным достижением автора получение автономно светящихся трансгенных растений с увеличенной яркостью. При этом для табака (*Nicotiana tabacum* и *Nicotiana benthamiana*) удалось повысить яркость свечения более чем на порядок по сравнению со свечением растений с ранее использованной биолюминесцентной системой грибов. Применяв новые генно-инженерные конструкции, автору также удалось впервые получить 3 вида автономно светящихся растений: *Arabidopsis thaliana*, *Populus canadensis* и *Petunia hybrida*. Успех работы был связан с проведением сложной и кропотливой работы по отбору ферментов, обладающих оптимальными характеристиками для последующего использования в биолюминесцентных репортерных системах. Для этой цели была использована комбинация направленного и случайного мутагенеза. Благодаря использованию улучшенных вариантов ферментов и получению разных их комбинаций удалось на 1-2 порядка улучшить яркость свечения при экспрессии полученных конструкций в культуре клеток растений, млекопитающих и дрожжей по сравнению с ранее описанной биолюминесцентной системой грибов.

Автором было показано, что применение улучшенной системы FBP3 в растительных клетках приводит к увеличению интенсивности люминесценции на два порядка по сравнению с бактериальной биолюминесцентной системой. Менее эффективна эта система в сравнении с бактериальной при использовании в клетках млекопитающих. Однако ее можно использовать для регистрации свечения в планшетных люминометрах, чего не удавалось достичь при использовании исходной биолюминесцентной системы грибов.

Показанная возможность применения системы для систематического сравнения транскрипционных единиц на основе высокопроизводительного агробактериального заражения полусухих агрегатов культуры растительных клеток будет полезна широкому кругу исследователей.

Хотелось бы отметить возможность использования разработанных биолюминесцентных систем, основанных на ферментах грибов, для аналитических целей. В связи с широким применением препаратов и биологически активных добавок, содержащих кофеинную кислоту и её производные, актуальной является разработка методов их определения в составе таких продуктов, а также оценка возможности анализа соответствующих соединений и их метаболитов в биологических жидкостях пациентов.

По диссертационной работе есть несколько вопросов и небольшие замечания. Первая фраза во введении не совсем точно дает определение биоломинесценции. Стр. 38 – бета-меркаптоэтанол может оказывать как негативное, так и положительное воздействие на ферменты в зависимости от его концентрации. Ссылки на работы в российских изданиях принято давать до англоязычных, причем если статья переведена на английский, то лучше давать ссылку на русский вариант (например, на статьи в журнале «Биохимия»). Непонятно что за ссылка под номером 351. Мне кажется, что лучше использовать латинские сокращения, рекомендованные редакцией журнала «Биохимия». У диссертанта три варианта: русский (АТФ), латинский (АМР) и самый странный - смешанный (НАДН).

На рис. 27 приведены данные, по которым рассчитывали  $K_m$  и  $V_m$  для мутантной люциферазы и фермента дикого типа. Хотя в целом выводы о свойствах двух форм фермента верны, однако значения  $K_m$  определены неверно, так как они практически совпадают с концентрацией субстрата в последней экспериментальной точке. Сравнение эффектов при использовании систем FBP1, FBP2 и FBP3 (рис. 42 -44) следовало бы делать более точно и конкретно. Так, превосходство FBP3 выражено только в опытах, приведенных на рис. 42, на рис. 43 данных по этой системе нет, а на рис. 44 результаты с FBP2 и FBP3 одинаковы. О преимуществах систем FBP2 и FBP3 в опытах на петуниях судить сложно из-за отсутствия данных о системе FBP1.

Высказанные в отзыве замечания носят рекомендательный характер и не умаляют ценности интересного и важного исследования, проведенного Е.С. Шаховой.

Достоверность и значимость полученных результатов обусловлена грамотным использованием современных методов молекулярной биологии, а также разумным планированием экспериментов и адекватной оценкой полученных результатов.

Выводы диссертационной работы научно обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам. Полученные результаты не вызывают сомнений в объективности и достоверности. Статистическая обработка данных проведена корректно с использованием современных методов.

В целом, результаты диссертационной работы характеризуются высокой степенью новизны и имеют существенную теоретическую и научно-практическую значимость.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, хорошо обоснованы и полностью подтверждены приведенными экспериментальными результатами.

Основные результаты диссертации опубликованы в научных изданиях. Так, по теме диссертации опубликовано 3 журнальных статьи в изданиях, рекомендованных Минобрнауки России, причем в двух статьях Е.С. Шахова является первым автором. Кроме того, результаты

работы были представлены на различных научных конференциях, тезисы докладов которых также были опубликованы.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Заключение. Диссертационное исследование «Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов», является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи, важной для развития молекулярной биологии. По актуальности, использованию широкого набора методов, новизне, объему экспериментальных данных, научной и практической значимости диссертационная работа Екатерины Сергеевны Шаховой полностью соответствует критериям (в том числе п. 9-14), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в современной редакции со всеми изменениями и дополнениями), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Доктор биологических наук, профессор,  
заведующий отделом биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Владимир Израилевич Муронец

Контактные данные:

адрес: Москва, 119992, Ленинские горы, дом 1, строение 40,  
рабочий e-mail: [vimuronets@belozersky.msu.ru](mailto:vimuronets@belozersky.msu.ru)  
рабочий телефон: +7(495) 939-14-56,

18 мая 2026 г.

Подпись В.И. Муронца заверяю

и.о. директора

Научно-исследовательского института  
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова  
член-корреспондент РАН

