

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Замятиной Анны Валерьевны «Иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

Анна Валерьевна Замятина представила на суд диссертационного совета и оппонентов оригинальное и цельное исследование. Работа, безусловно, методически сложна и при этом хорошо продумана, логично построена и прекрасно выполнена. Название исследования выглядит с первого взгляда как решение частной проблемы, но это не так. Тема диссертации весьма актуальна и важна, на мой взгляд, по двум причинам.

Во-первых, важен и актуален сам объект исследования – С-терминальный домен пороформирующего токсина гемолизина II *Bacillus cereus*. Восковая бацилла (*B. cereus*) часто вызывает пищевые токсикоинфекции у человека, сопровождающиеся эметическим и диарейным синдромами, иногда принимающие тяжелое течение. Клетки и споры *B. cereus* нередко обнаруживаются в пищевых продуктах и, кроме того, могут быть одной из причин внутрибольничных инфекций. В настоящее время очевидно, что в патогенезе инфекционного процесса, вызываемого *B. cereus*, ключевую роль играют энтеро- и экзотоксины, которые вырабатываются во время роста вегетативных клеток в тонком кишечнике. Предполагается, что диарейные синдромы, наблюдаемые у пациентов, вызваны различными токсинами: гемолизинами, фосфолипазой, негемолитическим энтеротоксином, энтеротоксином Т, цитотоксином К и их комплексами. Среди них внимание автора привлек гемолизин II, который является гомологичным по своей структуре α -токсину стафилококка и содержит несколько структурных доменов. Порообразование, вызываемое гемолизином II в мембранах различных эукариотических клеток (в том числе иммунных), приводит к их гибели. С-терминальный домен критически важен для стабильности и функциональности токсина. Известно, что он способен образовывать уникальные бочкообразные β -складчатые олигомерные цис- и транс-изомерные формы. Функциональное значение С-терминального домена заключается в рецепторном связывании с мембранами, способности к олигомеризации токсина, стабилизации поры, модуляции иммунного ответа. При отсутствии С-концевого домена гемолитическая активность токсина снижается в 8 раз. Изучение функций и структуры С-терминального домена гемолизина II важно для разработки ингибиторов, блокирующих связывание токсина с клетками, вакцин на основе доменов токсина, диагностических маркеров для выявления патогенных штаммов бацилл. Поэтому исследование

функциональной роли С-концевого домена гемолизина II *V. cereus* в процессе пороформирования представляется весьма важной и актуальной задачей.

Во-вторых, для решения этой задачи актуален основной метод исследования – иммунохимический анализ. В современной экспериментальной биологии очень часто для исследования структуры и функций клеток и макромолекул используют иммунохимические подходы. Исследование Анны Валерьевны Замятиной позволяет заглянуть на эту иммунохимическую «кухню» и понять, как надо создавать и правильно применять столь тонкие инструменты, как, в частности, получение моноклональных антител, твердофазный иммуноанализ, проточная цитофлуориметрия и мн.др.

Эти обстоятельства определяют актуальность и важность исследования Анны Валерьевны Замятиной, имеющего все признаки научной новизны и, возможно в дальнейшем, практической значимости.

Теперь позвольте перейти к содержательной части работы. Диссертация построена по классическому плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, состоящей из методической главы и главы с описанием полученных результатов и их обсуждения. Далее следует заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 247 источников. Работа имеет объем 133 страницы; 32 рисунка и 9 таблиц адекватно иллюстрируют текстовую часть диссертации.

Во введении обсуждается актуальность и степень разработанности темы диссертации, формулируются положения, выносимые на защиту, цель и задачи исследования, подчеркивается его научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Приводятся данные о методологии исследования, степени достоверности и апробации результатов, публикационной активности автора, его личном вкладе в исследование.

В обзоре литературы подробно рассматривается роль доменной структуры в функционировании белков, приводится общая характеристика бактериальных токсинов с акцентом на порообразующие токсины. Излагается общая характеристика токсинов *V. cereus*. Достаточно детально описываются структура и функции гемолизина II *V. cereus* и его С-терминального домена. На мой взгляд, обзор в достаточной степени вводит в контекст исследований в этой области и подводит к направлению, выбранному диссертантом. Обзор, в целом, написан хорошим литературным языком, прозрачно и логично, отлично проиллюстрирован. Лишь изредка встречаются орфографические («говорить об этом», «повреждая митохондрий») и стилистические («воспаление ... белка-3») неточности. Эти мелкие замечания можно отнести к разряду формальных, и они не портят общего хорошего впечатления от обзора литературы.

Методическая часть вместила описание (с разной степенью подробности) более десяти различных методик. Не все они сравнимы по трудоемкости. Однако совершенно очевидно, что часть методов и процедур может выполнить лишь квалифицированный специалист с достаточным багажом знаний и хорошими руками. Это, в частности, получение и наработка панели моноклональных антител, эпитопное картирование моноклональных антител с применением технологии фагового дисплея, проточная цитофлуориметрия и др. Отмечу хорошее владение диссертантом целым набором биохимических, иммунологических и молекулярно-генетических методов, которые были использованы автором в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*. Иногда диссертант, стремясь к более полному описанию методик, уделяет излишне подробное внимание общеизвестным методам. Еще одна неточность: при описании методов получения моноклональных антител автор постоянно ссылается на работу [9] – это тезисы конференции, посвященные роли микроорганизмов группы *Bacillus cereus* в этиологии пищевых токсикоинфекций. Совершенно очевидно, что произошла ошибка, скорее всего, имелась в виду ссылка [10] – «Практикум по иммунологии».

В третьей главе диссертант представил основные результаты работы. Безусловно, эти результаты можно было получить лишь при безупречном владении перечисленным выше арсеналом современных методов. Анна Валерьевна успешно справилась с поставленными в работе задачами.

Вероятно, чтобы читатели не забыли, в начале этой главы диссертант дословно повторяет цель работы. Кроме того, на мой взгляд, раздел 3.1. следовало бы поместить в предыдущую главу.

На первом этапе работы автором была получена панель моноклональных антител к С-терминальному домену гемолизина II *B. cereus*, проведены изотипирование и хроматографическая очистка выделенных антител, методом иммуноблоттинга проверена их специфичность. Моноклональные антитела были наработаны в препаративных количествах, чистота препаратов составляла не менее 95%. Были определены классы и подклассы полученных антител. Все моноклональные антитела из полученной панели эффективно взаимодействовали с рекомбинантным С-терминальным доменом гемолизина II (в нативной и денатурированной формах, а также в составе полноразмерного токсина). Несомненно, что полученные результаты основаны на тщательной и скрупулезной подготовке эксперимента и характеризуют автора как весьма квалифицированного биохимика и иммунолога.

На следующем этапе методом фагового дисплея был определен эпитоп на молекуле рекомбинантного белка для одного из антител. Основываясь на результатах исследования,

автор делает совершенно справедливый вывод о том, что полученные антитела могут быть использованы в качестве маркера для отслеживания уровня экспрессии различных рекомбинантных белков, оптимизации технологических процессов и увеличения количества продукта в ходе биотехнологического производства.

Затем автором был проведен скрининг панели полученных моноклональных антител на предмет подавления гемолитической активности гемолизина II *B. cereus in vitro*. В результате из всей панели полученных моноклональных антител был выявлен один клон (НyuIIС-20), который ингибировал гемолитическую активность, и определена константа аффинности взаимодействия выбранного антитела с рекомбинантными препаратами гемолизина. При этом был обнаружен эффект штамм-специфической защиты от гемолиза антителом НyuIIС-20, который определялся существованием гемолизина II в различных изоформах. Кроме того, способность к нейтрализации токсинов отобраным антителом была проверена в экспериментах *in vivo*.

На следующем этапе работы диссертантом было исследовано взаимодействие С-терминального домена гемолизина II *B. cereus* с мембранами клеток-мишеней (эритроцитов). С использованием биотинилированного препарата С-терминального домена гемолизина II *B. cereus* были определены количественные характеристики (константы аффинности) этого взаимодействия с мембранами эритроцитов, выделенных от кролика, мыши и человека. Была проверена способность С-терминального домена гемолизина II к олигомеризации в присутствии мембран эритроцитов и липосом. Продемонстрирована зависимость олигомеризации гемолизина II от присутствия антител НyuIIС-20.

Завершающая часть работы посвящена изучению воздействия С-терминального домена гемолизина II *B. cereus* на клетки иммунной системы. Результаты экспериментов показали, что наиболее чувствительными к действию препарата оказались Т-клетки, макрофаги и моноциты, в отличие от В-клеток, на которые препарат практически не действовал. Методом проточной цитофлуориметрии также было показано, что С-терминальный домен гемолизина II воздействовал на Т-клетки, причем эффект был пролонгирован во времени и требовал микромолярных концентраций токсина. Были определены константы аффинности этого взаимодействия.

Оценивая главу основного содержания в целом, следует с уважением отметить, что автором осуществлен очень большой объем экспериментальной работы, проведенной самыми современными адекватными методами, вследствие чего были получены новые весьма интересные и достоверные результаты, обладающие как фундаментальным, так и прикладным значением.

В разделе «Заключение» диссертации суммируются полученные результаты и предлагаются шесть вполне обоснованных и достоверных выводов из проведенного исследования, важнейшим из которых мне представляется тот факт, что С-терминальный домен способствует увеличению локальной концентрации мономеров гемолизина II на мембране клетки-мишени, инициируя таким образом их олигомеризацию, что объясняет повышенную цитолитическую активность полноразмерного токсина, в сравнении с гомологами, не имеющими С-терминального домена.

Таким образом, можно констатировать, что диссертационная работа Анны Валерьевны Замятиной выполнена на весьма высоком методическом уровне. Полученные экспериментальные данные интерпретированы на основе тщательного осмысления литературного материала и представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков в области биохимии, иммунологии и токсикологии. Материалы диссертации весьма широко представлены в печати (5 статей в рецензируемых изданиях), в материалах международных и российских конференций (15 работ). Работа была поддержана грантом РФФИ. В целом, диссертация написана ясно и логично, хорошо проиллюстрирована. Автореферат диссертации полностью отражает ее основные положения.

Переходя к итоговой оценке диссертации, хочется еще раз подчеркнуть, что большинство высказанных здесь немногочисленных критических замечаний не касается сути исследования и в существенной степени могут рассматриваться как пожелания автору. У меня нет принципиальных замечаний к содержанию диссертации. При этом, исходя из большого опыта автора в исследовании токсина, хотелось бы получить ответы на вопросы: (1) поскольку С-терминальный домен гемолизина II играет важную роль в механизме действия токсина и является перспективной мишенью для антимикробной терапии, могут ли помочь для решения этой проблемы полученные автором моноклональные антитела и, отсюда, (2) насколько, по мнению автора, реальна перспектива практического воплощения лечения заболеваний, вызываемых *B. cereus*, антителами к С-терминальному домену.

Изложенное выше дает основание заключить, что диссертационная работа «Иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*» представляет собой целостное экспериментальное исследование, которое по актуальности, новизне, достоверности, значимости для науки и практики соответствует критериям, предъявляемым к кандидатской диссертации Разделом 2 (п. 9-14) «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции) а ее автор

Анна Валерьевна Замятина, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунохимии
Института биохимии и физиологии
растений и микроорганизмов –
обособленного структурного подразделения
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
“Саратовский научный центр
Российской академии наук”(ИБФРМ РАН)
410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13
Тел.: +7(8452)970403;
E-mail: dukman_1@ibppm.ru



Лев Абрамович Дыкман

Подпись Л.А. Дыкмана «ЗАВЕРЯЮ»
Ученый секретарь ИБФРМ РАН, к.б.н.



О.Г. Селиванова

10 февраля 2025 г.