

Утверждаю

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, академик РАН, д.м.н., профессор,

И.А. Дятлов

« 4 » февраля 2025 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы
Замятиной Анны Валерьевны
«Иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия

Актуальность темы исследования. Одним из основных факторов патогенности *Bacillus cereus*, этиологического агента пищевых токсикоинфекции и внутрибольничных инфекций, является гемолизин II (НлуII), относящийся к классу β -складчатых каналобразующих цитолизинов. Известно, что удаление С-терминального домена белка НлуII приводит к значительному снижению его гемолитической активности, однако роль данного участка полипептида в порообразующей функции и лизисе клеток остается не выясненной. В этом плане, несомненно, актуальна рецензируемая работа, посвященная иммунохимическому анализу С-терминального домена гемолизина II, секретируемого *B. cereus*, и выявление его возможной роли в процессе порообразования.

Достоверность и новизна положений, выводов и заключения.

Достоверность полученных результатов опирается на статистическую обработку и не противоречит современным научным данным. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, вытекают из результатов проведенных исследований и подтверждены фактическим материалом.

Получены 24 стабильных гибридных клон, продуцирующих высоко специфичные моноклональные антитела к различным участкам рекомбинантного препарата НлуIISTD, использование в диссертационном исследовании для определения функциональной роли НлуIISTD. Определен эпитоп антитела НлуIIС-15, распознающего тромбиновый сайт. Обнаружено антитело НлуIIС-20, способное подавлять цитолитическую активность гемолизина II. Штамм-специфическая нейтрализация токсина была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Впервые, с использованием МАТ, продемонстрирована способность НлуIISTD связываться с клеточными мембранами. Определены количественные показатели этого взаимодействия с эритроцитами различной природы. Также, впервые продемонстрирована способность НлуIISTD образовывать олигомерные формы в присутствии эритроцитов.

Впервые исследовано действие С-терминального домена НлуIISTD на клетки иммунной системы. А именно эффективное разрушение клеток Т-клеточного происхождения, в меньшей степени макрофагального происхождения и отсутствие

активности по отношению клеток В-клеточного происхождения. Определены количественные характеристики взаимодействия HlyIICTD с клетками иммунной системы.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Цель работы соответствует заявленной теме диссертации, а поставленные задачи позволили раскрыть ее суть. Диссертантом вынесено на защиту 3 положения, которые последовательно и аргументированно обоснованы в рецензируемой рукописи и в 20 научных работах по теме диссертации. Все выводы диссертационного исследования основаны на продуманном плане работ, сочетании классических и современных методов, достаточном объеме фактического материала, полученном с использованием общепринятых биологических моделей и протоколов, наличии соответствующих контролей, статистическом анализе полученных результатов.

Теоретическая и практическая значимость.

В теоретическом плане ценность представляет вклад диссертационного исследования в понимание механизма действия гемолизина II *B. cereus*. Присутствие С-терминального домена в составе полноразмерного токсина, обладающего способностью независимо связываться с мембранами клетки-мишени, обеспечивает более высокую гемолитическую активность гемолизина II по сравнению с гомологичными представителями β-пороформирующих токсинов.

Полученная представительная панель высоко специфических моноклональных антител к HlyIICTD может быть использована для разработки диагностических тест-систем для обнаружения гемолизина II *B. cereus*, необходимых при лабораторной диагностике заболеваний и выборе терапевтической стратегии, а также при исследовании продуктов питания.

На фоне растущей антибиотикорезистентности определение участка молекулы, ответственного за блокирование гемолитической активности токсина, полезно как для создания препаратов, нейтрализующих действие гемолизина II (HlyII) *B. cereus*, так и миметиков - действующих частей высокоспецифичных и безвредных вакцин.

Полученные результаты по использованию моноклональных антител в качестве инструмента исследования функционирования токсинов белковой природы используются в учебном процессе при проведении теоретических и практических занятий на факультете БиомедФармТехнологий Пущинского филиала Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» (ПущГЕНИ филиал РОСБИОТЕХ).

Оценка содержания диссертации, ее завершенность.

Диссертационная работа изложена на 133 страницах, содержит 32 рисунка, 9 таблиц и 4 формулы, и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, благодарности, список сокращений и условных обозначений, список публикаций и список литературы (247 источников, из которых 201 - отечественный и 76 - иностранных).

Во **введении** диссертации четко обозначена актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность; положения, выносимые на защиту; данные об апробации работы, публикациях и структуре диссертации, свидетельствующие о соответствии требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по этим позициям.

В **обзоре литературы (глава 1)** представлен обширный материал, творчески осмысленный автором. Обобщены данные, касающиеся особенностей пороформирующих токсинов. Рассмотрена роль доменной организации в функционировании белков. Представлена классификация бактериальных токсинов, с уделением особого внимания β-пороформирующим токсинам. Подробно представлены этапы и механизмы порообразования, а также свойства пространственных структур. Часть обзора посвящена

характеристике токсинов *B. cereus* и описанию известных на сегодняшний день данных по гемолизину II и его С-терминальному домену.

Во **второй главе** приведены материалы и методы исследований. Для решения поставленных задач, использованы методы получения и характеристики моноклональных антител. Выделяются исследования посвященные изучению взаимодействия НlyIICTD с эритроцитами и их эпитопному картированию. Действие НlyIICTD на клетки иммунной системы изучено с привлечением проточной цитометрии и количественным определением констант аффинности взаимодействия белка. Таким образом, использованные биохимические, клеточные, иммунохимические и физико-химические методы анализа, со статистической обработкой результатов позволяют заключить, что экспериментальная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Описание методологии естественно перетекает в изложение результатов исследования.

Глава 3 «**Результаты и обсуждение**» содержит информацию об аминокислотной последовательности рекомбинантного НlyIICTD, получении панели из 24 моноклональных антител к рекомбинантному препарату НlyIICTD с их последующей идентификацией. антитела могут быть перспективными при разработке диагностических тест-систем для детекции гемолизина II *B. cereus* в различных биологических жидкостях и продуктах питания.

В диссертационной работе проведена локализация эпитопа, узнаваемого моноклональным антителом НlyIIС-15 и предложено дальнейшее использование МАТ в качестве маркера при отслеживании уровня экспрессии различных рекомбинантных белков, оптимизации технологических процессов увеличения количества продукта в ходе биотехнологического производства, а также для удаления дополнительных пептидных участков, необходимых для экспрессии и очистки конечного генно-инженерного продукта. МА НlyIIС-15, НlyIIС-34 и НlyIIС-37 связывались с линкерным пептидом. Направленное против сайта распознавания тромбином НlyIIС-15 может быть полезным при создании генно-инженерных препаратов.

В экспериментах *in vitro* продемонстрирована способность антитела НlyIIС-20 нейтрализовать действие полноразмерного гемолизина; установлено, что нейтрализация токсина происходит за счет ингибирования процесса олигомеризации его мономеров, а также доказано, что для подавления гемолиза необходимо присутствие в первичных последовательностях НlyII аминокислоты L324 и значительное снижение подавления гемолиза при аминокислотной замене Leu/Pro. Способность МАТ НlyIIС-20 блокировать токсическое действие НlyII из нескольких штаммов *B. cereus* была продемонстрирована *in vivo* в организме мышей линии BALB/c, что свидетельствует о перспективности разработки на его основе лекарственных препаратов, способных подавлять действие гемолизина II *B. cereus*.

Впервые показана способность С-терминального домена гемолизина II целенаправленно взаимодействовать с мембранами эритроцитов и олигомеризоваться в их присутствии, что объясняет более высокую эффективность лизиса клеток-мишеней полноразмерным НlyII в сравнении с гомологами, не имеющими С-терминального удлинения. Описано литическое действие НlyIICTD на макрофагальные и Т-клеточные линии. Различие констант аффинности, характеризующих взаимодействие НlyIICTD с различными клетками свидетельствуют о его зависимости от химического состава клеточных мембран, что вносит вклад в изучение механизма действия гемолизина II секретируемого *B. cereus*.

Заключение подводит итог проделанной работе, в нем обобщены и проанализированы полученные данные, а также определены возможные направления использования результатов диссертационной работы. Выводы, представленные автором, полностью отражают полученные результаты диссертационного исследования и соответствуют поставленным задачам. Текст диссертации достаточно иллюстрирован, что облегчает восприятие материала.

По результатам исследования Замятиной А.В. сформулированы 6 выводов. Выводы диссертации логичны и вытекают из проделанной работы, соответствуют поставленным цели и задачам диссертационной работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации, подтверждения опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Автореферат диссертации позволяет получить полное представление о проведенном исследовании. Основные результаты работы отражены в 20 научных работах, в том числе пять – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации и 15 публикаций в сборниках докладов и тезисов в материалах российских и международных научных конференций. Тематика всех включенных в список публикаций, соответствует теме диссертационного исследования. Материалы, изложенные в диссертации, представлены и обсуждены на 14-ти международных, всероссийских и региональных научных конференциях.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом. Представленная на отзыв диссертация Замятиной Анны Валерьевны «Иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия, представляет практическую ценность, а автор показала себя способным и профессионально состоявшимся научным работником. Диссертационная работа является оригинальным, самостоятельным исследованием.

При анализе диссертационной работы возникли следующие **вопросы**:

1. В части «Теоретическая и практическая значимость исследования» говорится о возможности использования эпитопа антитела НlyIIС-20 в качестве терапевтической мишени при разработке лекарственных препаратов. Однако в работе был определен эпитоп для антитела НlyIIС-15. Почему не был определен эпитоп для антитела НlyIIС-20?

2. На стр. 46 диссертационной работы говорится, что «Для блокирования свободных мест связывания, лунки заполняли раствором PBST (150 мМ NaCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄, 0,1% Tween–20) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре». Требуется уточнения, что явилось блокирующим агентом в данном случае. Обычно используют 1%-ный раствор БСА, 2%-5% желатин или 5% обезжиренное молоко. Если в данном случае блокирует, вероятно, 0,1% Tween–20, достаточна ли концентрация этого детергента?

По тексту диссертации встречается незначительное количество орфографических ошибок, неудачных использований англоязычных терминов, сокращений, не указанных в разделе «Список сокращений и условных обозначений».

Однако заданные вопросы не влияют на основные выводы и защищаемые положения диссертации Замятиной А.В.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Таким образом, диссертация Замятиной Анны Валерьевны «Иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи – определение функциональной роли С-концевого участка гемолизина II *B. cereus* в порообразовании, вносящее существенный вклад в изучение бактериальных порообразующих токсинов. По актуальности, научной новизне, практической и теоретической значимости, а также объёму проведенного исследования диссертация полностью соответствует требованиям, установленным п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Анна Валерьевна Замятина, заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Отзыв на диссертацию Замятиной Анны Валерьевны «Иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*» заслушан и утвержден на заседании Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (протокол № 1 от 4.02. 2025 г.)

Доктор медицинских наук, глав. науч. сотр. лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

/ Светлана Владимировна Дентовская /

Кандидат биологических наук, вед. науч. сотр. лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

/ Павел Христофорович Копылов /

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Оболенское шоссе (территория «Квартал А»), д. 24. E-mail: info@obolensk.org; dentovskaya@obolensk.org; kopylov@obolensk.org; телефон: +7 (4967) 36-00-03 / +7 (4967) 36-00-10, Web-сайт <https://www.obolensk.org/home-ru/>

Подписи Дентовской С.В. и Копылова П.Х. подтверждаю

Ученый секретарь



/ Любовь Васильевна Коломбет /