



Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)**

п. Оболensk, Серпуховский район, Московская область, 142279

тел: (4967) 36-00-03, факс: (4967) 36-00-10

e-mail: info@obolensk.org, <http://www.obolensk.org>

ОКПО 78095326 ОГРН 1055011113772 ИНН 5077018190 КПП 507701001

28.01.2019 № 150-50/21-04-98-2019

На № 12304-6224 от 18.01.2019

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

декабря 2018 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 Каратовской
Анны Петровны «Иммунохимическое исследование литических ферментов AlpA и
AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1», представленной к защите на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия**

Актуальность избранной темы исследования.

На основе культуральной жидкости бактерии *Lysobacter* sp. XL1 разработан
комплексный ферментный антибактериальный препарат лизоамидаза, обладающий

широким антимикробным спектром действия в отношении патогенных микроорганизмов устойчивых к антибиотикам. Лизоамидаза включена в реестр фармацевтических препаратов Российской Федерации в качестве лекарственного средства для местного применения. Литические свойства лизоамидазы обусловлены ферментами, входящими в ее состав, разрушающими клеточные стенки бактерий, дрожжей, грибов и простейших. Наиболее изученными из секретируемых внеклеточных ферментов *Lysobacter* sp. XL1 являются эндопептидазы AlpA и AlpB с молекулярными массами около 22 и 24 кДа, соответственно. Механизмы созревания функционально активных форм ферментов не изучены, не стандартизирован контроль за количеством активной субстанции в препарате лизоамидаза. Представленная Каратовской Анной Петровной диссертационная работа важна, поскольку органы здравоохранения должны иметь в своем арсенале стандартизированные по качеству лекарственные средства, а также четкое понимание механизмов секреции литических ферментов, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1 для оптимизации методов получения препарата.

Цель диссертационной работы заключалась в разработке методов иммунохимической идентификации и количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 на основе моноклональных антител.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации.

В качестве научной новизны автор указывает, что в диссертационной работе впервые получены представительные коллекции гибридных клеток – продуцентов МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1. Разработаны высокочувствительные тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА на основе МА для количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1. Проведенные автором количественное определение содержания молекулярных форм AlpA и AlpB «сэндвич»–ИФА и их детекция иммуноблоттингом в клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1 показали, что AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Для доказательства значимости для науки и практики результатов диссертации автор указывает, что с помощью разработанных тест–систем на основе моноклональных антител

возможны стандартизация и проведение контроля качества антимикробных препаратов на основе ферментов, секретируемых грамотрицательной бактерией *Lysobacter* sp. XL1 – лизоамидазы и препаратов, разрабатываемых в настоящее время с использованием рекомбинантных штаммов–продуцентов.

Автором впервые проведена количественная оценка содержания ферментов AlpA и AlpB и их молекулярных форм в различных компартментах клетки с использованием полученных моноклональных антител.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы

В работе использованы современные были использованы современные иммунологические, иммунохимические и биологические методы. Полученные результаты исследования представлены в репрезентативном объеме проанализированных данных и статистическом анализе их достоверности. Результаты проведенных исследований доложены на различных научно-практических мероприятиях. Таким образом достоверность полученных результатов и научных положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений.

Личный вклад автора.

Анализ диссертационной работы Каратовской А.П. показывает, что автор участвовала в получении большей части результатов, изложенных в диссертации. Самостоятельно получены неперекрестные МА к пропептидам и зрелым формам литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1; проведены иммунохимическая характеристика МА к пропептидам и зрелым формам AlpA и AlpB; наработка МА *in vivo* и *in vitro*; очистка МА; создание тест–систем в варианте «сэндвич»–ИФА на основе полученных МА; количественная оценка содержания пропептидов и зрелых форм AlpA и AlpB в исследуемых препаратах; установлена локализации молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB в клетках *Lysobacter* sp. XL1 иммуноблоттингом.

Микробиологические и биохимические этапы работы, связанные с культивированием и получением клеточных фракций бактерии *Lysobacter* sp. XL1, получение рекомбинантных белков проводились в лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ РАН, г. Пущино (заведующая лабораторией к.б.н. Васильева Н.В).

Соискатель принимал непосредственное участие в интерпретации и обсуждении всех полученных результатов, в оформлении публикаций и их подаче.

Общая характеристика диссертационной работы.

Диссертация изложена на 120 страницах, содержит 26 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 301 источник отечественной и зарубежной литературы.

Диссертационная работа содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы.

Основная часть обзора литературы посвящена описанию методов получения моноклональных антител и их использованию в науке и практике. Представлены данные о сериновых эндопептидазах AlpA и AlpB и лизоамидазе.

В главе «Материалы и методы исследования» дана информация об объектах исследования, описаны способ получения и очистки моноклональных антител, проведения ИФА, схема иммунизации животных, приведена информация о методах математической и статистической обработки результатов.

Анализ и обсуждение полученных результатов проведенного исследования приведены в разделе «Заключение», в котором обобщены и детально проанализированы полученные данные. Выводы, представленные автором, отражают результаты собственного исследования и соответствуют поставленным перед исследованием задачам. Автореферат оформлен в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Результаты собственных исследований представлены подробно в третьей главе. Итогом проведенной работы явилось получение моноклональных антител к пропептидам ProA и ProB и сериновым эндопептидазам AlpA и AlpB, что позволило разработать тест-системы в формате «сэндвич»–ИФА. Трудность в получении моноклональных антител обуславливалась высокой гомологией между пропептидами ProA и ProB, а также между зрелыми формами эндопептидаз AlpA и AlpB. Методом гибридомной технологии было получено по 12 стабильных гибридных клонов, секретирующих моноклональные антитела против ProA и ProB и. Все моноклональные антитела, полученные против ProA и ProB, не обладали иммуноперекрестной реактивностью между собой и со зрелыми формами эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемыми *Lysobacter* sp. XL1. Моноклональные антитела против ProA и ProB характеризовались высокой аффинностью.

Для получения моноклональных антител против AlpB, не имеющих иммуноперекрестных реакций с AlpA, получали рекомбинантные пептиды с уникальной для AlpB аминокислотной последовательностью. Такой подход позволил получить 5 моноклональных антител к эндопептидазе AlpB. Все полученные антитела к эндопептидазе AlpB узнавали только фермент AlpB и не обладали иммуноперекрестной реактивностью по отношению к гомологичной эндопептидазе AlpA и пропептидам и характеризовались высокой аффинностью.

Вторая часть работы была посвящена разработке методов количественного определения содержания зрелых форм ферментов AlpA и AlpB и их пропептидов в сложных

биологических смесях. Для этого были разработаны детектирующие тест–системы в формате «сэндвич»–ИФА с использованием полученных моноклональных антител. Сконструированные ИФА тест–системы характеризовались следующими линейными диапазонами: для ProA – 1,5 – 100 нг/мл; для ProB – 0,2 – 6,25 нг/мл; для зрелой формы AlpA – 0,2 нг/мл – 3,1 нг/мл. Ошибка измерений при определении ProA и ProB составляла 6,0%, при определении зрелой формы AlpA – 5,0%.

В следующем разделе работы Каратовской А.П. была продемонстрирована возможность использования тест–систем для количественного определения исследуемых ферментов в препарате лизоамидаза. Проведенный диссертантом анализ отдельных компартментов бактериальной клетки позволил выявить, что окончательное созревание исследуемых ферментов происходит в периплазме, а за пределы клетки попадают только зрелые формы. Также было показано, что AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве.

В ходе ознакомления с диссертационной работой возник вопрос по методу очистки иммуноглобулинов класса G. При выполнении диссертационной работы для выделения иммуноглобулинов класса G был использован рекомбинантный белок A, конъюгированный с агарозой («ThermoFisher Scientific Pierce», США). В то же время хорошо известно, что белок A специфически связывается с большинством подклассов IgG человека и кролика. Эффективность связывания с мышиными IgG2a, IgG2b и IgG3 низка, а с IgG1 (доминирующий подкласс в сыворотке) – практически отсутствует (Thermo Scientific Pierce Antibody Production and Purification Technical Handbook). В диссертационной работе все выделенные мышиные моноклональные антитела относились к подклассу IgG1. Для выделения мышиных IgG1 антител обычно используется либо рекомбинантный белок G, либо A/G. В связи с этим возникает вопрос: какой рекомбинантный белок использовался в данной работе для очистки иммуноглобулинов мыши? Или в описании метода допущена опечатка?

В диссертационной работе имеется техническая неточность: Название п.2.10 в содержании «Определение литической активности» (стр.3) не совпадает с названием п.2.10 «Определение бактериологической активности» на стр. 56. В соответствии с методом, описанным в п.2.10 «Бактериолитическую активность определяли турбидиметрически по уменьшению поглощения при 540 нм суспензии автоклавированных клеток *Staphylococcus aureus* 209–P». Результаты данных экспериментов в главе 3 «Результаты и обсуждение» отсутствуют.

В целом результаты исследований находятся в строгом соответствии с поставленными задачами и последовательно изложены в работе. Работа выполнена на современном уровне, методически правильно, полученные результаты обоснованы, достоверны и содержат научную новизну.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 03.01.04 Биохимия.

Результаты диссертационной работы апробированы на международных и российских научных конференциях. Материалы диссертации отражены в 11 опубликованных работах, 3 статьи из которых включены в издания, рекомендованные Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Таким образом, диссертационная работа выполнена на достаточном объеме экспериментальных данных с использованием современных методов исследования. Уровень статистического анализа полученных результатов соответствует поставленным задачам и достоверность полученных результатов является несомненной.

Заключение

Диссертационная работа Каратовской Анной Петровной «Иммунохимическое исследование литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата химических наук Руденко Натальи Васильевны, и содержит новое решение актуальной научной задачи по стандартизации и проведению контроля качества антимикробных препаратов на основе ферментов, секретируемых грамотрицательной бактерией *Lysobacter* sp. XL1. Актуальность проблемы, значительный объем исследований, их современный методологический уровень, принципиальная новизна, высокая научно-практическая значимость соответствуют всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335).

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Каратовской Анны Петровны «Иммунохимическое исследование литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1», отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Ученого Совета ФБУН ГНЦ ПМБ
Роспотребнадзора (протокол № 9 от 19 декабря 2018 г.).

ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии»
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ),

Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ
Роспотребнадзора
доктор биологических наук,
Фирстова Виктория Валерьевна

Подпись Фирстовой В.В. заверяю:

Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора
доктор биологических наук Коломбет Л.В.
142279, Оболенск,
Серпуховской р-н, Московской обл.,
тел. (4967) 36-00-03 Email: info@obolensk.org
« 15 » декабря 2018 г.

