

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора химических наук, главного научного сотрудника, **Мирошникова Константина Анатольевича** на диссертационную работу **Матолыгиной Дарьи Андреевны** на тему: «Бактериолитические свойства интерлейкина-2 человека», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Д.А. Матолыгиной, представленная на защиту, посвящена экспериментальному развитию недавнего существенного открытия – обнаружение противомикробной активности белка интерлейкин-2. Этот цитокин играет важнейшую роль в регуляции множества сигнальных путей в организме человека. Однако в данном случае рассматривается необычная роль интерлейкина-2, непосредственное влияние белка на бактериальные клетки, приводящее к их гибели путем лизиса. Этот эффект воспроизводимо наблюдается *in vitro* и подтвержден рядом публикаций. Гипотеза о наличии у интерлейкина-2 активного центра, осуществляющего ферментативное расщепление пептидогликана клеточной стенки бактерий, чрезвычайно интересна и находится в контексте открытий последних десятилетий – прецедентов ферментативной активности РНК, ДНК и антител. Экспериментальное подтверждение бактериолитической активности интерлейкина-2, определение оптимальных условий протекания реакции, потенциального участка ферментативного расщепления в составе пептидогликана и круга бактериальных субстратов, на которые действует интерлейкин-2, имеет очевидную актуальность и практическую значимость.

Степень новизны, обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Методическим достоинством диссертации Д.А. Матолыгиной можно считать разработку единого экспериментального алгоритма турбидиметрического

измерения бактериолитической активности на живых бактериальных клетках. Снижение оптической плотности суспензии бактерий при действии целевого вещества вследствие осмотического лизиса клеток используется в качестве качественного феноменологического доказательства противобактериального действия в течение многих десятилетий. В диссертации Д.А. Матолыгиной представлен математический аппарат для количественного выражения бактериолитической активности, который может использоваться для сравнения различных бактериолитических агентов, оценки активности препарата при различных условиях или в присутствии дополнительных веществ. Разработанный алгоритм довольно удобен, хотя и не отражает всего разнообразия биологических механизмов потери жизнеспособности бактерий, которая не обязательно сопровождается лизисом клеток.

В контексте диссертационного исследования стандартизация методики позволила гармонизировать проведенные эксперименты и получить результаты, которые поддаются прямому сравнению. Таким образом, автор получает дополнительную основу для анализа и достоверности выводов.

Достоверность и апробация результатов исследования

Проведённая работа идеологически целостна. Для достижения конечного результата был скомпонован обоснованный план исследований, разделенный на логичные экспериментальные этапы. Используемые Д.А. Матолыгиной методы исследования обеспечили выполнение поставленных задач и статистическую значимость полученных данных. Совокупность экспериментальных результатов позволяет оценить работу Д.А. Матолыгиной как законченный труд с обоснованными выводами и научно-практическими рекомендациями.

Основные положения и выводы диссертации отражены в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Апробация работы проведена в виде представления на ряде научных конференций. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной

работы Д.А. Матолыгиной «Бактериолитические свойства интерлейкина-2 человека» отражают содержание диссертации.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация Д.А. Матолыгиной построена по традиционному плану. Материал изложен на 145 страницах текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список использованных литературных источников (414 источников), и справочное приложение. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 39 рисунками.

Во введении автором обоснована цель исследований и определены задачи, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы (50 страниц, 8 глав) представляет собой изложение современных данных о строении клеточной стенки бактерий, различных биологических факторах, оказывающих бактериолитическое действие путем нарушения целостности пептидогликана клеточной стенки, типах ферментов, осуществляющих деградацию пептидогликана, низкомолекулярных эффекторах, влияющих на активность таких ферментов, методах измерения активности бактериолитических ферментов. Подробно рассмотрены данные о структуре и биологии действия двух белков – собственно интерлейкина-2 (основного объекта исследования) и лизоцима куриного яйца (использованного в качестве объекта сравнения для оценки ферментативного действия на бактериальный пептидогликан). Обзор литературы характеризуется широтой рассмотренного материала, хорошей структурированностью, живым и доступным языком изложения, а также наглядными иллюстрациями. Обзор литературы диссертационной работы Д.А. Матолыгиной может служить хорошим справочным материалом для специалистов, работающих в области микробиологии и механизмов действия противомикробных ферментов. Определенные нарекания

вызывает заключительная часть обзора литературы, в которой приводится краткая характеристика микроорганизмов, исследованных в ходе диссертационной работы. По мнению оппонента, сведения об изучаемых бактериях даны весьма поверхностно, с явным уклоном в медицинскую патогенность. Лишь малая часть рассмотренных микроорганизмов является прямыми патогенами, для большинства же их медицинское действие описывается как «условные» или «нозокомиальные» патогены, то есть болезнетворное действие наблюдается только у пациентов с ослабленной иммунной системой. В этом контексте на уровне *in vivo* следует учитывать оказывать не только прямое бактериолитическое действие интерлейкина-2 на инвазивные микроорганизмы, но его регуляторную роль в системе иммунитета пациента.

Изложение методов исследования и статистической обработки в главе «Материалы и методы» дано очень чётко, не вызывает сомнений возможность повторения исследований и воспроизведения результатов с использованием приведенных в диссертации протоколов.

Часть диссертации «Результаты и обсуждение» разделена на главы «Выбор модели сравнения для изучения бактериолитических свойств интерлейкина-2 человека», «Сопоставление данных для единого подхода к расчету скорости ферментативного лизиса живых бактериальных клеточных субстратов турбидиметрическим методом», «Скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 и лизоцима на различных бактериальных клетках», «Зависимость начальной скорости лизиса от pH в присутствии интерлейкина-2, лизоцима и додецилсульфата натрия для различных видов бактериальных клеток», «Зависимость начальной скорости лизиса бактерий *E.coli* и *L.plantarum* от ионной силы в присутствии интерлейкина-2 и лизоцима», «Влияние потенциальных эффекторов на активность интерлейкина-2 и лизоцима для бактерий *E.coli*» и «Адсорбция интерлейкина-2 на поверхности клеток *E.coli*».

Как было сказано выше, разработка единого метода оценки скорости лизиса бактерий является сильной стороной диссертации. Применение

турбидиметрического метода было исчерпывающе обосновано и предложен аппарат расчета активности исследуемого бактериолитического вещества. Фактически, применимость предложенного метода была верифицирована многочисленными статистически достоверными экспериментами по изучению под действием интерлейкина-2 и лизоцима множества различных штаммов бактерий с различающимся составом клеточной стенки, влияния физических условий и низкомолекулярных эффекторов на бактериолитический эффект, оказываемый исследуемым белком. Проверочные эксперименты подтверждают правильность и универсальность разработанной методики в контексте диссертационного исследования.

На основании анализа полученных результатов диссертантом предлагаются гипотезы ферментативного механизма действия интерлейкина-2 на пептидогликан клеточной стенки бактерий. В частности, делается предположение, что потенциальным субстратом для интерлейкина-2 может служить диаминопимелиновая кислота (A2pm) – компонент пептидного мостика пептидогликана, присутствующий у бактерий, чувствительный к интерлейкину-2.

В целом, диссертационная работа Д.А. Матолыгиной отличается логичной схемой проведенных исследований, качественными таблицами и иллюстрациями, поясняющими результаты экспериментов. Три вывода работы в целом соответствуют поставленным в начале работы задачам, и позволяют считать основную цель работы достигнутой. Научные положения, выносимые на защиту, в полной степени отражены в результатах работы и соответствуют паспорту заявленной специальности 03.01.04 – биохимия.

Замечания

При изучении текста диссертации возникает ряд вопросов:

1. Гипотеза о ферментативной атаке интерлейкином-2 диаминопимелиновой кислоты в составе бактериального пептидогликана чрезвычайно интересна. Однако это предположение сделано «от противного» - наличия этого компонента в составе чувствительных бактерий. Прямого же

экспериментального доказательства ферментативного действия не приведено. Поэтому, по мнению оппонента, утверждать это положение в качестве вывода работы несколько преждевременно.

2. В случае, если гипотеза о диаминопимелиновой кислоте в качестве субстрата расщепления интерлейкином-2 верна, то ферментативный механизм интерлейкина-2 оказывается совершенно иным, нежели чем у лизоцима, который гидролизует связь между ацетилглюкозамином и ацетилмурамоилом в углеводной цепи пептидогликана. С точки зрения турбидиметрии действие обоих белков приводит к лизису бактерий. Однако биологически лизоцим оказывается неудачным ферментом для сравнения, более логично было бы использовать для сравнительного анализа фермент, действующий на пептидную часть пептидогликана, например, эндопептидазу.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств работы, однако важны для идеологического продолжения этого интересного и важного проекта.

Заключение

Диссертационное исследование **Матолыгиной Дарьи Андреевны** «Бактериолитические свойства интерлейкина-2 человека», выполненное под руководством д.х.н., профессора Левашова Андрея Вадимовича и к.х.н. Левашова Павла Андреевича, является завершенной научно-квалификационной работой.

По актуальности, новизне, методическому уровню и практической значимости результатов, объему проведенных исследований, диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, и оформлена согласно Приложениям № 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова», а ее автор, Матолыгина Дарья Андреевна,

заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Официальный оппонент,
Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией
молекулярной биоинженерии
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» (ИБХ РАН),
доктор химических наук

Константин Анатольевич Мирошников

04.06.2019

Специальность, по которой официальным
оппонентом была защищена диссертация:
03.01.04 – «биохимия»,
03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Контактные данные:

адрес места работы: 117991, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
тел.: +7 (495) 335-55-88, e-mail: kmi@ibch.ru.

Подпись Константина Анатольевича Мирошникова заверяю:

Заместитель директора
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»
доктор физико-математических наук, профессор

Роман Гербертович Ефремов

