

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Буйновской Нины Сергеевны
“Гибридные бифункциональные лиганд-связывающие белки на основе
высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296
(СмАР)”

на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4 – “Биохимия”

Актуальность темы диссертации и научная новизна полученных результатов.

Представленная на отзыв диссертационная работа Н.С. Буйновской направлена на получение, и исследование биохимических и биокаталитических свойств лектина морской мидии *Crenomytilus grayanus* (CGL) и порина бактериального патогена *Yersinia pseudotuberculosis* (OmpF). В ходе выполнения работы были получены бифункциональных лиганд-связывающие белки на основе высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (СмАР): СмАР-CGL и СмАР- OmpF. Исследуемые в работе белки и их химеры имеют перспективу применения в медицинской практики: для разработки тест систем и использования в качестве функционального агента при лечении раковых заболеваний. Во время выполнения работы были актуальны задачи исследования лектинов в качестве маркеров способных выявлять раковые клетки. В частности, актуальным, как с прикладной, так и с фундаментальной точки зрения было изучение сайта связывания лектинов с гликанами. В настоящее время в виду развития методов работы с антителами, актуальность использования лектинов в значительной мере снизилась. Однако анализ литературы показал, что в 2023 году было выпущено достаточное количество публикаций направленных на изучение лектинов, что лишний раз подчеркивает актуальность представленной работы.

Результаты исследований Н.С. Буйновской отличаются новизной поскольку впервые были описаны химерные конструкции лектина морской мидии *C. grayanus* (CGL) и неспецифического порообразующего белка наружной мембраны (НМ) возбудителя псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* (OmpF), объединенные с геном высокоактивной ЩФ морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (СмАР), СмАР/CGL и СмАР/OmpF полученные в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3). Охарактеризованы их лиганд-связывающие и ферментативные свойства. Показана возможность использования СмАР/CGL и СмАР/OmpF для выявления методами ИФА муциноподобных онкомаркеров и антител к возбудителям псевдотуберкулеза соответственно.

Впервые обнаружена дефосфорилирующая активность рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии SmAP в отношении бактериальных липополисахаридов, что может являться основой для разработки методов борьбы с эндотоксимией.

В процессе выполнения работы впервые при помощи структурного анализа *in silico* и направленного мутагенеза изучен лиганд связывающий сайт галактозоспецифичного лектина CGL морской мидии. В результате была детализирована структура сайтов связывания тримерного лектина CGL с углеводными детерминантами муциноподобных онкомаркеров, оценен вклад отдельных аминокислотных остатков активного центра CGL и его окружения в углевод-связывающую активность и установлен механизм его связывания с такими лигандами, как муцин и глоботриоза.

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов.

Достоверность результатов исследования обеспечена применением современных генно-инженерных, биохимических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов исследования, адекватных поставленным задачам. Результаты всех экспериментов получены с использованием сертифицированного оборудования, и представлены в виде достаточном для подтверждения выводов, сделанных автором работы. Результаты работ представлены в виде докладов на конференциях и публикаций в рецензируемых журналах.

Структура и объем работы. Диссертационная работа содержит следующие разделы: “Введение”, “Обзор литературных данных”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Выводы”, “Список литературы”. Диссертация изложена на 149 страницах, содержит 9 таблиц 31 рисунок, список литературы включает 203 источника. Во введении автор обосновывает актуальность задачи и формулирует задачи исследования. “Обзор литературных данных” можно разделить на 3 основные части и одну дополнительную. В основных частях изложена информация по исследуемым белкам: щелочная фосфатаза, лектины и неспецифические бактериальные порины. В четвертой части представлена информация о перспективах использования лектинов и поринов в лечении инфекционных заболеваний в частности короновиральной инфекции SARS-CoV-2. В разделе представлен значительный объем информации по исследуемым белкам их применению в медицинской практике, возможности их модификации. В целом обзор литературы дает представление об объекте исследования, подчеркивает актуальность и перспективы темы диссертационной

работы. В разделе “Материалы и методы” описаны протоколы исследовательских работ, которые могут быть повторены соответствующими специалистами. В разделе “Результаты и обсуждение” автор последовательно излагает результаты выполненных исследований и дает анализ опираясь как на собственные так почерпнутые из литературы данные. Полученные результаты наглядно представлены в таблицах и отображены на рисунках. В разделе выводы автор суммирует главные результаты, полученные в ходе работы. В целом можно заключить, что проведенные исследования выполнены на высоком уровне с использованием современных молекулярно-биологических, биохимических и компьютерных методов. Подробно описан связывающий центр исследованного лектина, разработана методика наработки химерных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF, выявлены их лиганд связывающие свойства. Показана возможность использования CmAP/CGL и CmAP/OmpF для выявления онкомаркеров СА 19-9 и РЭА для диагностики рака поджелудочной железы и колоректальной карциномы. Показано, что гомогенный препарат высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы CmAP подавляет пролиферацию клеток карциномы (Т-47D) и аденокарциномы молочной железы (MDA-MB-231). Представленные выводы конкретны и отражают суть выполненных исследований.

Объем и качество исследований, выполненных Н.С. Буйновской явно демонстрируют, что работа может быть представлена на соискание степени кандидата биологических наук. Однако поверхностный анализ литературы по тематике диссертации показал, что данные могли быть представлены в более рейтинговых журналах. Есть некоторые замечания связанные с оформлением работы во введении чрезмерно много места отведено методологии и недостаточно описанию актуальности объектов исследования. Полученные в ходе выполнения работы продуценты являются скорее исследовательским вариантом. Предполагается ли выполнение дальнейших работ по разработке продуцента? Также не ясно, ожидается ли практическое применение полученных данных и материалов для практического применения в медицинской практике. Какие шаги предпринимаются в этом направлении? При прочтении диссертации не хватило информации о сравнении структуры связывающего центра лектинов с разной специфичностью. Так же стоит отметить что при цитировании наличие ошибок и не согласованных предложений, особенно в обзоре литературы.

Заключение о соответствии диссертации требованиям Положения о присуждении учёных степеней. Диссертация представляет собой завершённое оригинальное научное исследование, соответствующее паспорту специальности 1.5.4 – Биохимия. Диссертационное исследование Н.С. Буйновской по актуальности, методическому уровню, новизне и значимости полученных результатов, выводов и полноте их опубликования отвечает требованиям п. 9 “Положения о присуждении ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации N 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г. и № 1168 от 01.10.2018 г. “О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней”), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Н.С. Буйновская заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - биохимия.

Официальный оппонент, Розанов Алексей Сергеевич
Краснодарский край, пгт, Сириус, ул. Голубая 11, к101
+7-913-722-66-44, Sibiryak.n@gmail.com

Кандидат биологических наук

Ведущий научный сотрудник, направления «Биотехнология», Научного центра трансляционной медицины, АНО ВО «Университет «Сириус»

*Верно.
Кандидат наук
Александр Иванович
Косенко И.С.
30.11.2023*

