

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу ЛЕГОЦКОГО Сергея Александровича "Получение, изучение свойств, стабилизация рекомбинантного эндолизина бактериофага S394 и разработка способа эффективного лизиса грамотрицательных бактерий", представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия, 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Несмотря на революционное открытие антибиотиков как класса лекарственных препаратов, а также постоянное расширение их количества, создания новых антибиотиков – бактериальные инфекции продолжают оставаться бичом человечества. Основная причина этого заключается в стремительно развивающейся резистентности бактерий не только к традиционным, но и к новым антибиотикам. Хотя, конечно, число бактериальных инфекций очень велико, и число антибиотиков тоже множится день ото дня, и в результате подавляющее большинство бактериальных инфекций излечимы – тем не менее в настоящее время существует целый ряд бактериальных инфекций, которые плохо поддаются лечению всеми известными антибиотиками, либо полностью резистентны к известным препаратам.

В результате, несмотря на актуальность проблемы бактериальных инфекций, многие исследователи и фармацевтические компании уменьшают спектр и количество производимых антибиотиков – это зачастую перестает себя оправдывать: если из 10 новых антибиотиков один сумеет преодолеть резистентность некой инфекции – это уже большая победа, а чаще приходится «отрабатывать» сотни потенциальных лекарств в поисках единственного действенного.

Работа С.А. Легоцкого посвящена принципиально иному подходу борьбы с бактериальными инфекциями, а именно разработке терапии бактериофагами, или отдельными цитолитическими ферментами бактериофагов, которые разрушают клеточные стенки бактерий. Проблема резистентности при таком подходе не стоит, однако возникает ряд других проблем, которые решаются автором диссертационной работы.

Вопреки традиции, обсуждение работы я начну с литературного обзора, хотя это и не основополагающая часть работы. Сразу же при знакомстве с работой обращает на себя внимание неординарно большой объем литературного обзора и количество затронутых тем. Последнее, по моему мнению, несколько излишне – автор пишет

будто монографию, причем единую тему этой «монографии» даже сложно сформулировать, поэтому общий заголовок литобзора отсутствует. Это ВСЕ, что мы можем обсудить про бактерии, бактериофаги, ферменты бактериофагов, их устойчивость в разных условиях, про дестабилизацию клеточных мембран и т.д. и т.п. На мой взгляд, подраздел литературного обзора 3.2 писать, тем более столь подробно, в конечном итоге было не обязательно: описанные методы не применяются в данной работе.

С другой стороны, несмотря на необъятность литобзора, одна из тем, прямо касающаяся диссертационной работы, в нем фактически не представлена – а именно обсуждение методологии измерения проницаемости внешней мембраны. Нигде подробно не обсуждается такой субстрат как  $\beta$ -лактамаза, его функции и основы определения активности. Понятно, что имеется фирменный субстрат и соответствующий мануал – но тем не менее теоретические детали работы  $\beta$ -лактамазы как, с одной стороны, фермента с собственной активностью, а с другой – субстрата для измерения проницаемости мембран, полностью исчезли из рассмотрения, что, на мой взгляд, упущение.

Новизна работы заключается в основном в том, что бактериофаг и его фермент, выбранный автором в качестве объекта исследований – совершенно новый; о нем практически ничего не известно. И несмотря на то, что работа с ним строится по традиционному для энзимологических исследований плану (нахождение гена, клонирование, подбор условий индукции соответствующего белка, его выделение и исследование свойств) - когда этот «традиционный план» прикладывается к ранее неизвестному объекту – всегда приходится сильно отступать от его «традиционности» и проявлять творческие способности и изобретательность. Не стал исключением и описываемый случай. Особенно интересный и заслуживающий внимания момент – это обнаружение близко гомологичной последовательности эндолизина бактериофага EPS7, отличающейся отсутствием 57-ми аминокислот с N-конца белковой молекулы. Казалось бы, при анализе целого ряда гомологий это не может иметь принципиального значения – но автор «зацепился» за такую особенность и осуществил дополнительные эксперименты, создав укороченную версию своего объекта – Lys394. При этом обнаружилось, что, несмотря на высочайшую гомологию этих двух белков и известную ферментативную активность «короткого» EPS7 – N-

концевой фрагмент в Lys394 абсолютно необходим для ферментативной активности белка.

Следующим этапом работы стала оптимизация условий выделения фермента, от выбора продуцента до выбора штамма клеточной культуры. Были найдены условия, позволяющие получить максимальный выход, отработаны условия очистки для получения гомогенного препарата (как полномерного, так и укороченного). Следующей логичной задачей было исследование физико-химических свойств белка, зависимости от pH, температуры, ионного состава среды, катионов металлов, концентрации собственно фермента и т.д. Хотя все эти стадии эксперимента можно назвать рутинными (необходимы при исследовании любого нового фермента) – тем не менее они выполнены добросовестно, подробно и с величайшей тщательностью.

Несколько особняком в традиционном модуле исследования новых ферментов стоит тот факт, что обычно субстрат фермента известен. В данном случае дополнительной задачей стал поиск субстратов, а именно ответ на вопрос, на какие (и на все ли) виды бактерий действует полученный фермент. Было показано, что он обладает широкой специфичностью в отношении грамотрицательных бактерий, и практически не действует на грамположительные.

Таким образом, получен ферментативный препарат – эндолизин фага S394, в чистом виде, исследованы его свойства и бактерицидное действие в отношении грамотрицательных бактерий. Следующей, более сложной, задачей было обеспечение взаимодействия между данным ферментом и его субстратом на клеточных культурах, поскольку внешняя клеточная мембрана препятствует доступу фермента к субстрату – пептидогликану. Поэтому далее были предприняты попытки увеличения проницаемости клеточных мембран, достаточного для эффективного применения Lys394 снаружи клеток.

При исследовании большого числа разнообразных агентов были подобраны оптимально действующие, причем они оказались различными для клеток находящихся в виде суспензии или в виде газона. Измерение проницаемости внешней мембраны осуществлялось по регистрации активности  $\beta$ -лактамаз, вышедших во внеклеточную среду. Заметим, что эту методику хотелось бы видеть в более подробном описании.

И наконец, последней задачей данного исследования была разработка условий максимальной стабильности фермента: понятно, что для использования в перспективе для практических целей, фермент со временем жизни несколько дней не годится.

Подбором большого числа комбинаций стабилизирующих агентов было достигнуто время стабильности и сохранения активности препарата до 150 суток при 37°C и до 4 месяцев при 20°C.

Определение активности фермента осуществлялось при измерении мутности клеточной суспензии вследствие лизиса интактных клеток. Несмотря на подробное описание процесса, возникает один вопрос: прибор с термостатируемой кюветой нареканий не вызывает. Но процесс измерения мутности суспензии занимает некоторое время, за которое под действием силы тяжести клетки оседают в нижнюю часть кюветы, таким образом уменьшая фоновые параметры. Каким образом автор избавлялся от этого эффекта? Был ли какой-то способ (перемешивание, встряхивание), позволяющий держать фоновую мутность на постоянном уровне в течение всего эксперимента? Следовало бы об этом упомянуть.

Таким образом, диссертационная работа С.А.Легоцкого представляет собой логично построенное и в целом законченное исследование, содержащее необходимый элемент новизны. Вместе с тем следует отметить, что часть вопросов практического применения препарата остались открытыми. Подробно описано действие препарата на клетки. При этом очевидно, что данный фермент может быть использован для обеззараживания поверхностей, для контроля бактериальных загрязнений и т.п. Но самая сложная задача, а именно возможности медицинского применения (наряду с антибиотиками) в работе подробно не обсуждается, и вопрос остается открытым. От клетки до мыши, и тем более до человека – «дистанция огромного размера». При этом автор даже теоретически не пытается обсуждать, каким образом полученные им результаты, хотя бы в отдаленной перспективе, могут реализоваться в качестве медицинского препарата, что представляло бы максимально важную задачу.

Следует сделать несколько мелких замечаний, касающихся формальностей оформления работы. Так, мне не кажется удачным обозначение целевого фермента: «Lys», помимо «лизис» означает еще и «лизин». Аминокислота лизин, полилизин и прочее в разных контекстах встречается в тексте диссертации многократно, и фермент Lys394 иногда теряется в этом контексте. Было бы логичнее назвать белок SLys394, LysS394 или как-то аналогично, чтоб даже при беглом прочтении он отличался от лизина.

В списке трудов, приведенных в автореферате, три последних обозначены, как «первый автор et al». А поскольку первым автором является не диссертант – его фамилия (а также его место в списке авторов, если этот список длинный) – остается вне текста, что нелогично.

В целом можно сказать, что работа посвящена достаточно сложной тематике и выполнена с честью. Описан новый, ранее не известный, фаговый фермент, полностью охарактеризован с точки зрения оптимальных условий, стабильности и активности. Выводы работы соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Диссертационная работа ЛЕГОЦКОГО С.А. полностью соответствует требованиям к кандидатским диссертациям, изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор безусловно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия, 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник  
лаборатории молекулярных основ действия  
физиологически активных соединений

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

Москва 119991, ул. Вавилова, д. 32.

Тел. (499)135-05-90

Ve\_tun@mail.ru

Д.х.н.



ТУНИЦКАЯ В.Л.

