

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук Гринченко Андрея Викторовича

на тему: «АГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И НОВЫЙ БЕЛОК-АГГЛЮТИНИН *MkC1qDC* ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MODIOLUS KURILENSIS*:

ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ТКАНЕВАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА»

по специальностям 1.5.22. Клеточная биология; 1.5.4. Биохимия

Актуальность избранной темы

Актуальность темы диссертационного исследования А.В. Гринченко не вызывает никаких сомнений по целому ряду обстоятельств. Массовые и широко распространенные виды морских беспозвоночных, в том числе двустворчатые моллюски, включая объект исследования *Modiolus kurilensis* — представителя древнего рода из семейства митилид, известного еще с девонского периода, являясь по природе своей фильтраторами, могут служить надежными биомаркерами в ходе мониторинга морских экосистем в условиях высокого антропогенного пресса. Действительно, в качестве одного из важных оценочных параметров при экологическом мониторинге может рассматриваться состояние клеток и белковых компонентов их гемолимфы, включая гуморальные факторы иммунной системы. В работе описан и характеризуется новый белок, содержащий домен C1q (*MkC1qDC*), синтезируемый гранулярными гемоцитами *M. kurilensis*. Как известно, у позвоночных C1qDC-белки являются ключевым компонентом иммунной системы комплемента, однако у беспозвоночных, включая двустворчатых моллюсков, они остаются крайне слабо изученными: выделены и охарактеризованы из них лишь единицы, в то время как геномы *Bivalvia*, по данным биоинформатики, содержат сотни генов, кодирующих такие белки. Наконец, актуальность исследования определяется еще и тем, что исследование затрагивает проблему становления защитных механизмов организма в эволюционном аспекте, которая пока остается недостаточно проработанной, несмотря на долгую историю изучения.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Научная новизна работы в первую очередь состоит в идентификации, выделении и определении первичной аминокислотной последовательности *MkC1qDC* — лектинподобного белка плазмы *M. kurilensis*, обладающего высокой специфичностью в отношении гликанов; впервые охарактеризована его агглютинирующая и антибактериальная активность. Следует подчеркнуть, что автор не ограничился, как нередко бывает, лишь биохимическим и биоинформатическим исследованием, но пошел дальше: были получены поликлональные

антитела к *MkC1qDC*, проверена их специфичность, после чего с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии была установлена внутри- и внеклеточная локализация нового белка. Важной частью работы явилась оценка влияния *MkC1qDC* на опухолевые клетки человека *in vitro* и обсуждение полученных результатов — преимущественное «налипание» FITC-конъюгированного белка на поверхность именно опухолевых клеток — при сопоставлении известного аномального изменения их поверхности (гликозилирования/сиалирования) и выявленных свойств нового белка (высокой специфичности к сиаловой кислоте, муцину и т.д.). Несомненно, что проведенное исследование имеет не только несомненную научно-теоретическую значимость, но и высокий практический потенциал для целей онкодиагностики и разработки способов таргетной доставки противоопухолевых препаратов с использованием безопасных агентов природного происхождения.

Объем, структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа написана по традиционному плану, изложена на 167 с. машинописного текста и содержит разделы (главы): «Введение» (8 с.); «Обзор литературы» (29 с. — 4 подраздела); «Материал и методы» (17 с. — 16 подразделов, 1 табл.); «Результаты» (53 с. — 12 подразделов, 34 рис., 3 табл.), «Обсуждение результатов» (24 с. — 4 подраздела) и 6 выводов. Список цитированной литературы содержит 376 источников (21 — на русском языке, 355 — на английском). Диссертация выстроена и изложена логично, дизайн всех экспериментов хорошо продуман, текст работы четко структурирован, написан хорошим и грамотным научным языком, понятен, легко читается. Весьма импонирует, облегчает восприятие материала и заслуживает особой похвалы представление в конце каждого раздела своеобразного мини-заключения/обобщения/резюме.

Во введении к диссертации автор объясняет выбор тематики исследования и делает акцент на морских беспозвоночных как источнике уникальных соединений, имеющих высокий потенциал применения в медицине и биотехнологии, особый интерес из которых представляют агглютинины. Четко сформулирована цель исследования — анализ агглютинирующей активности гемолимфы *M. kurilensis* — и 6 конкретных задач, которые в ходе выполнения работы диссертантом успешно решены.

Раздел «Обзор литературы» охватывает основные аспекты в контексте дискуссионных вопросов, которые остаются на сегодняшний день, в рамках тематики исследования. Он имеет аналитический, а не чисто реферативный характер, читается с большим интересом и создает полное представление о научной проблеме, уровне ее

проработки, а также высоком уровне академической подготовки автора и его широкой эрудиции. Вместе с тем этот раздел не перегружен деталями. Считаю, что представленный текст может служить основой для написания хорошей обзорной статьи о роли гемолимфы дальневосточных *Bivalvia* в защитных реакциях организма, в том числе в условиях неблагоприятной экологической обстановки, ее литических факторах, агглютинах, включая потенциальную значимость углеводов-распознающих белков для биомедицинских разработок.

Раздел «Материал и методы» свидетельствует о высоком профессионализме диссертанта — внимательного, скрупулезного, тонкого и знающего исследователя. Впечатляет разнообразие использованных в работе современных методик — трудоемких, требующих больших временных затрат и аккуратности. Все приведенные протоколы полностью воспроизводимы. В работе использован комплекс классических и современных методов биохимии, физиологии, цито- и гистохимии, биоинформатики. Нет никакого сомнения, что диссертант освоил всё многообразие упоминаемых в диссертации методик, глубоко разбирается в каждой из них, а также, где необходимо, лично разработал их модификации для решения конкретных задач. В частности, усовершенствован протокол выделения и очистки белка. Использование предложенной автором схемы привело к успеху и показало ее высокую эффективность. Кроме того, предложены способы стандартизации концентрации ионов Ca^{2+} в ходе гемолитических реакций при оценке агглютинирующей и литической активности гемолимфы. Эти с формальной точки зрения «методические» фрагменты исследования помещены не в «методический» раздел, а в «Результаты», но, учитывая оригинальность подходов и новизну, я не увидел серьезных причин придраться к этому обстоятельству и, наоборот, согласен с автором.

В разделе «Результаты» подробно изложены и проиллюстрированы высококачественными рисунками (графиками, гистограммами, микрофотографиями цито- и гистологических препаратов, результатами выравнивания аминокислотных последовательностей белков, блоттинга и т.д.) все этапы экспериментальной работы. Снова обращает внимание четкость и логичность изложения экспериментальных результатов; у читателя не остается сомнений в необходимости проведения каждого последующего опыта после получения и осмысления результатов предыдущего. В итоге автор последовательно и умело подводит читателя к дальнейшей дискуссии и обобщающим выводам диссертации.

Важнейшие результаты проведенного комплексного исследования следующие. Диссертанту удалось идентифицировать и выделить новый белок *MkC1qDC*, определить его первичную аминокислотную последовательность и уровень гомологии с другими белками *Bivalvia*, содержащими домен C1q. Установлено, что *MkC1qDC* способен агглютинировать и

подавлять рост грамположительных и грамотрицательных бактерий; кроме того, он способен распознавать и проявлять цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток человека *in vitro*, в меньшей степени влияя на неопухолевые клетки. Автором получены поликлональные антитела к белку *MkC1qDC* и с их помощью установлена его внутриклеточная локализация в цитоплазме гранулярных гемоцитов *M. kurilensis* и внеклеточная — в гемальной системе и интерстициальном компартменте. В ходе работы был установлен диапазон естественной вариативности активности белков гемолимфы *M. kurilensis* в зависимости от места обитания моллюсков и сезона, а также при адаптации к хроническому стрессу при обитании в импактной акватории.

«Обсуждение» результатов носит непротиворечивый характер; данный раздел снова демонстрирует умение автора анализировать и правильно интерпретировать результаты собственных исследований в свете имеющихся представлений, вести научную дискуссию. Специальным предметом обсуждения послужили выявленные особенности агглютинирующей и литической активности белков гемолимфы *M. kurilensis* в течение года, выявленная зависимость литических факторов от ионов Ca^{2+} , чувствительность биохимических параметров плазмы гемолимфы *M. kurilensis* при стимуляции иммунного ответа бактериями и в условиях антропогенного стресса. Всесторонне обсуждаются строение и свойства лектинподобного белка *MkC1qDC*, обладающего высокой аффинностью к гликанам, который может рассматриваться как новый антибактериальный защитный фактор моллюсков. Обсуждая установленные свойства белка *MkC1qDC*, диссертант в конце раздела справедливо отмечает, что новый белок, обладая уникальным спектром углеводной специфичности и противомикробными свойствами, имеет высокий биомедицинский потенциал и может служить перспективным инструментом в области онкодиагностики и таргетной доставки противоопухолевых препаратов. С этим утверждением я полностью согласен и считаю, что раздел «Обсуждение» в целом, как и предыдущие разделы диссертации, заслуживает высокой оценки.

Критические замечания и вопросы к дискуссии

Существенных и принципиальных возражений, замечаний и вопросов по существу представленной диссертационной работы А.В. Гринченко, способных повлиять на ее высокую оценку, у меня нет. Те же вопросы, которые возникли, носят исключительно дискуссионный и редакционно-технический характер.

1. В порядке дискуссии хотел бы задать диссертанту вопрос: можно ли высказать какое-либо предположение о характере фолдинга белка *MkC1qDC*, его упорядоченных и

неупорядоченных доменах, поскольку от этого зависят и функции, и особенности локализации, и характер взаимодействия с другими белками.

2. Также в порядке дискуссии хочу задать вопрос относительно выявленного эффекта белка *MkC1qDC* на опухолевые клетки *in vitro*: не планируется ли в дальнейшем проведение опытов на лабораторных животных?

3. Поскольку, как пишет автор (с. 83), «ткани моллюсков обладают автофлуоресценцией», проводили ли контрольное фотографирование образцов, не обработанных никакими антителами для определения уровня аутофлуоресценции? Использовали ли для контроля обработку препаратов только вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом? Как сравнивали интенсивность флуоресценции (и сравнивали ли), кроме визуальной оценки, на опытных и контрольных образцах? Автор описывает лишь качественные показатели (например, «немного более яркое свечение», с. 83) и не приводит хотя бы полуколичественных данных об интенсивности флуоресценции.

4. Описывая рис. 28 (результаты иммуноцитохимического окрашивания гемоцитов с помощью антител к *MkC1qDC*), автор отмечает (с. 98): «...гемобласты имели наименьшую фоновую окраску, ...наиболее интенсивно светились базофильные гранулоциты, цитоплазма которых практически полностью относительно равномерно метилась на целевой белок. В эозинофильных гранулоцитах можно было различить отдельные гранулы, а агранулярные клетки показали содержание *MkC1qDC* главным образом по периферии клеток без выраженной окраски в цитоплазме». Как морфолог клетки, я не совсем согласен с такой трактовкой приведенных картин:

а) на фрагменте А3 (окрашивание цитоплазмы гемобластов) отчетливо видна как полностью неокрашенная, так и окрашенная клетка. Однако в последнем случае я бы не сказал, что речь идет лишь о «фоновом» свечении — скорее, о начале синтеза белка, но опять же необходимо сравнение с контрольными образцами, а также данные о соотношении окрашенных и неокрашенных клеток в исследованном материале;

б) в случае базофильных гранулоцитов (фрагмент Б3) цитоплазму нельзя назвать «окрашенной полностью» — в ней совершенно четко просматриваются неокрашенные области, имеющие к тому же довольно правильные контуры. Кроме того, о «равномерном мечении» цитоплазмы я бы тоже поостерегся говорить, поскольку на микрофотографии четко видны аморфные области, флуоресцирующие даже визуально более интенсивно по сравнению с окружающими участками цитоплазмы;

в) как следует из рисунка, особенность цитоплазмы эозинофильных гранулоцитов (фрагмент В3) действительно состоит в присутствии ярко флуоресцирующих гранул, но аморфные области флуоресценции (пусть и меньшей интенсивности, чем в базофильных

гранулоцитах, если, конечно, микроскопические наблюдения сделаны при одинаковых параметрах микроскопа) также наблюдаются, и это следовало отметить;

г) наибольшие вопросы вызывает трактовка изображения на фрагменте ГЗ (агранулоциты). Во-первых, все 3 представленные клетки имеют разные паттерны флуоресценции, особенно клетка в правом верхнем углу, в которой к тому же практически отсутствует кортикальный F-актин, — это точно такая же клетка, что и 2 остальные? Во-вторых, из этих двух оставшихся одна клетка демонстрирует четкую периферическую локализацию *MkC1qDC*, а другая — нет, и что тогда означает авторское «*главным образом по периферии*»? Каков процент агранулоцитов, демонстрирующих тот или иной паттерн окрашивания? Наконец, флуоресценция цитоплазмы очень даже «выражена», как и на ВЗ.

В связи с этим у меня вопрос к автору: что он думает о действительной локализации *MkC1qDC*? Что представляют собой гранулы в цитоплазме гранулоцитов, какой биологический смысл может состоять в аккумуляции в них *MkC1qDC*? Присутствие каких клеточных структур могут отражать области аморфной флуоресценции? Идет ли речь о шЭПР, комплексах Гольджи или каких-то безмембранных биомолекулярных конденсатах? На самом деле я не вижу причин, по которым не проведено, например, обычное электронно-микроскопическое (иммуноэлектронное) исследование, результаты которого позволили бы получить дополнительную важную информацию о характере локализации *C1qDC* в клетках и тканях *M. kurilensis*.

5. Среди технических недочетов оформления рисунков следует отметить отсутствие буквенных обозначений фрагментов (А—В на рис. 1, А—З на рис. 2 и А—Ж на рис. 3), однако все необходимые параметры по вертикали графиков указаны.

6. Как и в любой большой работе, встречаются неудачные и (или) спорные фразы/выражения:

а) фраза «...белки... являются иммунными факторами, транскрипционная активность которых увеличивается...» (с. 126), по сути, неверна, поскольку транскрипционная активность касается генов;

б) когда речь идет о конгломератах FITC–*MkC1qDC* на поверхности клеток, некорректным является выражение «окраска гранулами» («окраска гранулами, которые иногда формирующие конгломераты», с. 133; кстати, предложение не согласованное). Во-первых, гранулы не краситель, да и конгломераты эти, с точки зрения цитолога, трудно назвать «гранулами», хотя толковые словари русского языка и определяют гранулу как «мелкий, плотный комочек какого-нибудь вещества»;

в) по оформлению текста мне не понравилось представление прилагательных «грамположительный» и «грамотрицательный» со знаками «+/-», например грам(+), вместо нормы, зафиксированной в орфографических словарях;

г) я понимаю, что выражение «введение патоген-ассоциированных молекулярных паттернов» (например, с. 116), скорее всего, пришло из англоязычной литературы, однако слово «паттерн», на мой взгляд, плохо согласуется с глаголом «введение»: *англ.* pattern — узор, образец, шаблон; форма, модель, схема; набор повторяющихся элементов, в морфологии — картина, характер (например, распределения антигена) и т.п.;

д) автору не удалось избежать пунктуационных, а кое-где и грамматических, ошибок. Однако хочу особо подчеркнуть, при прочтении действительно интересной научной работы мне меньше всего хотелось выискивать подобного рода погрешности — тем более перечислять в отзыве.

Следует отметить, что все высказанные замечания не подвергают сомнению выводы, сделанные по результатам экспериментальной работы, которые полностью достоверны, не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы А.В. Гринченко и не снижают ее научно-теоретической значимости и практической ценности полученных результатов. Выводы аргументированы и подтверждены на большом объеме экспериментального материала. Результаты диссертации полно и всесторонне освещены в 11 публикациях: 4-х статьях в международных журналах, в трех из которых диссертант является первым автором, 6 тезисах докладов, представленных на международных и российских конференциях и симпозиумах; имеется 1 патент. Автореферат соответствует тексту диссертации и дает полное представление об объеме, всех этапах экспериментальной работы, полученных результатах и выводах.

Заключение

Диссертация А.В. Гринченко является законченной (в рамках поставленных задач) научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной задачи по оценке свойств, локализации и агглютинирующей активности белков гемолимфы двустворчатых моллюсков, имеющей существенное значение для биомедицины и соответствующих отраслей знания — клеточной биологии и биохимии. По актуальности темы исследования, степени обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверности, новизне, научно-теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа «Агглютинирующая активность и новый белок-агглютинин MkC1qDC гемолимфы двустворчатого моллюска *Modiolus kurilensis*: идентификация, тканевая локализация и

свойства» соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции от 11 сентября 2021 года), а ее автор, Гринченко Андрей Викторович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.22 – Клеточная биология и 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)



Боголюбов Дмитрий Сергеевич

Контактные данные:

тел.: +7 (812) 2971847; E-mail: dbogol@mail.ru; dmitr@incras.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
1.5.22 – Клеточная биология (шифр и специальность на момент защиты: 03.03.25 – гистология, цитология, клеточная биология).

Адрес места работы:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

Подпись руки *Боголюбов Д.С.*
26.10.2022
Заверяю
Зав. канцелярией 

