

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова,
член-корр. РАН, д.м.н.



О.А. Свитич О.А. Свитич

22 ноября 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

на диссертацию Гришина Александра Владимировича на тему

«Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 1.5.11 – Микробиология

Актуальность темы выполненной работы

Несмотря на достижения современной медицинской науки, по-прежнему оппортунистические инфекции, вызываемые условно патогенными микроорганизмами, представляют серьезную проблему для здравоохранения во всех странах мира. Благоприятные условия для развития условно патогенных микроорганизмов создаются при нарушении целостности кожи и слизистых, а также ослаблении иммунитета, что может быть следствием всех видов хирургических операций, ранений, ожогов и иммунодефицитов, вызванных различными факторами (ВИЧ, наследственные патологии, онкологические заболевания, химиотерапия, лучевые поражения, травмы, экологическое неблагополучие и др.). Патогены могут локализоваться в очаге поражения (в ране, на поверхности кожи или слизистой), распространяться на смежные ткани, а также развиваться в глубоколежащие ткани, с проникновением в кровоток и возникновением сепсиса, который нередко заканчивается смертью. Следует заметить, что оппортунистические инфекции вносят основной вклад в смертность пациентов с вирусной пневмонией, в том числе вызываемой новой коронавирусной инфекцией. Поэтому актуальность исследований, связанных с борьбой с оппортунистическими инфекциями, не вызывает сомнения.

В настоящее время основным видом лечения бактериальных инфекций является антибиотикотерапия. В момент внедрения в медицинскую практику антибиотиков, они рассматривались как панацея от бактериальных инфекций. Однако, уже вскоре стало понятно, что микроорганизмы способны быстро вырабатывать антибиотикорезистентность, что усугубляется нерациональным использованием антибактериальных средств. Сейчас уже всем ясно, что устойчивость ряда бактерий, в том числе к вновь разрабатываемым антибиотикам, драматически возрастает от года к году.

Одним из важных механизмов выживания бактерий является способность к формированию биопленки, которая создает благоприятные условия защиты от иммунных реакций организма-хозяина и воздействий внешней среды. В биопленке происходит коммуникация между микроорганизмами, которые демонстрируют единый ответ, приносящий пользу всему бактериальному сообществу, при этом поддерживается оптимальный размер биопленки и координируется фенотипы вирулентности. Это позволяет бактериальному сообществу адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, что способствует распространению полезных для патогена мутаций в колонии биопленок, улучшает доступ к питательным веществам и способствует устойчивости к антибиотикам. В результате чего патоген успешно колонизирует органы и ткани больного с невозможностью успешной терапии заболевания.

Исходя из вышеизложенного, исследования по разработке методов разрушения бактериальных пленок представляются актуальными. В связи с этим, тема диссертационного исследования Гришина А.В. является весьма современной и актуальной, представляя большой практический и научный интерес. Также следует добавить, что объектами исследования диссертационной работы явились биопленки *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, которые представляются одними из наиболее клинически значимых условно патогенных микроорганизмов.

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

Целью диссертационной работы Гришина А.В. явилось испытание природных олиго- и полисахаридов в качестве соединений, блокирующих функции лектина LecA, исследование их влияния на биопленки *P. aeruginosa*, а также изучение действия комбинации ферментов лизоцифа и дисперсина В на биопленки *S. aureus*.

Для достижения этой цели автором исследована способность ряда растительных олиго- и полисахаридов взаимодействовать с лектином LecA и влиять на формирование и разрушение биопленок *P. aeruginosa*. Было впервые показано, что растительные олигосахариды вербаскоза, галактозил-маннотриоза и дигалактозил-маннопентаоза, а также

полисахарид галактан, способны взаимодействовать с лектином LecA *P. aeruginosa*. Поскольку одна молекула дигалактозил-маннопентаозы оказалась способна связывать две молекулы LecA одновременно, то это привело к увеличению аффинности. При этом аффинность дигалактозил-маннопентаозы к LecA оказалась выше аффинности всех описанных в литературе олигосахаридов.

Исследование полисахаридов показало, что наиболее выраженным эффектом обладал галактан картофеля. Продемонстрирована способность полисахарида галактана подавлять формирование биопленок *P. aeruginosa* и частично разрушать или изменять морфологию зрелых биопленок. Впервые показана способность соединений, связывающихся с лектином LecA (дигалактозил-маннопентаозы и галактана), не только ингибировать, но и стимулировать образование биопленок *P. aeruginosa* при их применении в определенном диапазоне концентраций, что крайне важно в свете популярности LecA в качестве мишени для разработки антибиопленочных соединений. Исследовано воздействие галактана на биопленки *P. aeruginosa* проведено впервые и показано, что он обладает специфическим антибиопленочным эффектом. При исследовании галактана разработан оригинальный вариант методики культивации биопленок *P. aeruginosa*. Поскольку олиго- и полисахариды, повреждающие биопленки, сами по себе не обладают бактерицидным эффектом, то автором было изучено их совместное применение с антибиотиками.

Для разработки методов разрушения биопленки грамположительного микроорганизма *S. aureus* автором были поставлены задачи по исследованию рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В. Первый белок обладает пептидазной активностью, разрушая клеточную стенку грамотрицательных микроорганизмов, а второй катализирует гидролиз линейных полимеров N-ацетил-D-глюкозаминов, содержащихся в матрицах биопленок. Исследовано совместное действие лизостафина и дисперсина В на биопленки *S. aureus* в сравнении с действием каждого из белков по-отдельности. При этом использовали простую смесь белков и слитый белок. Данный слитый белок, включающий последовательности лизостафина и дисперсина В, состыкованные глицин-сериновым спейсером, получен впервые. Показана более высокая эффективность слитого белка в отношении биопленок *S. aureus* по сравнению с простой смесью исходных белков.

Поскольку *S. aureus* часто вызывает осложнения при протезировании суставов, то автором поставлена задача исследования возможности введения лизостафина и дисперсина В в костно-пластические материалы для придания им антибиопленочных свойств. В результате продемонстрирована возможность адсорбции лизостафина на кальций-магниево-силикатной керамики диопсида, перспективного материала для костной пластики, что придает последнему антибактериальные и антибиопленочные свойства.

Теоретическая и практическая значимость диссертации

Теоретическая и практическая значимость исследования, проведенного Гришиным А.В. неоспоримы, поскольку описаны новые, не наблюдавшиеся ранее эффекты, оказываемые полисахаридами на бактериальные биопленки. Описанные в данной работе эффекты выявили сложный характер взаимодействия полисахаридов с биопленками и демонстрируют, что даже способность к разрушению биопленок не гарантирует, что полисахарид будет способствовать повышению их чувствительности к антибиотикам.

Гришиным А.В. отработана модель культивирования биопленок *P. aeruginosa*, которая может использоваться для микроорганизмов, формирующих биопленку на границе между воздухом и культуральной средой и удобна как для исследования структуры биопленок с помощью обычной и флуоресцентной микроскопии, так и для подсчета количества жизнеспособных клеток внутри биопленки.

Автор получил слитый рекомбинантный белок, обладающий бактериолитической активностью лизостафина и гликозидгидролазной активностью дисперсина В, который оказался высокоэффективным для разрушения биопленок *S. aureus*, что перспективно при разработке средств для борьбы с биопленками на основе белков-ферментов.

Проведенные исследования по адсорбции лизостафина на кальций-магниевого силикатной керамики диопсида открывают возможность практического использования, иммобилизованного лизостафина для разработки имплантатов с антибактериальными свойствами.

Личный вклад автора

Исходя из приведенных экспериментальных данных и списка публикаций Гришина А.В. можно сделать вывод, что автор непосредственно участвовал во всех этапах диссертационного исследования, самостоятельно написал рукопись диссертации и автореферат.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Гришиным А.В. результаты и выводы демонстрируют необходимость продолжения исследований в области разработки методов разрушения бактериальных пленок. При этом является перспективным использование нового метода культивирования биопленок *P. aeruginosa* для изучения микроорганизмов, формирующих биопленку на границе между воздухом и культуральной средой. Также важным является продолжение исследований по получению материала для эндопротезирования, обладающего антибактериальными и антибиопленочными свойствами.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация Гришина А.В. соответствует п. 4, 5, 6, 7, 12, 15 паспорта специальности 1.5.11 – Микробиология.

Достоверность и апробация результатов исследования

Соответствие данных нормальному распределению проверялось с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для определения статистической значимости различий между группами при нормальном распределении данных использовался двусторонний критерий Стьюдента (t-тест) с неравными дисперсиями. Для определения статистической значимости различий между группами в эксперименте с определением количества жизнеспособных бактерий в биоплёнках, обработанных антибиотиками, использовался двусторонний критерий Манна-Уитни. Различия считались значимыми при значениях $p < 0.05$, с учетом поправки Данна-Шидака на множественные сравнения.

Результаты диссертации представлены в 10 научных публикациях, из которых 5 – это статьи в научных изданиях, входящих в перечень ВАК и базы цитирования Web of Science и Scopus, что полностью соответствует требованиям по публикациям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Материалы диссертации были представлены на международной конференции The 2nd Conference on Natural Health (26-28 октября 2014 г., Алжир), международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2015» (13-17 апреля 2017 г., Москва), международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (20-22 февраля 2017 г., и 25-27 февраля 2019 г., Москва) и объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (3-8 октября 2021 г., Сочи).

Содержание и оформление диссертационной работы.

Диссертация Гришина А.В. написана по классическому образцу и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы, состоящий из 303 источников. Диссертационная работа составляет 197 страниц машинописного текста и включает 6 таблиц и 52 рисунка.

Во введении отражена актуальность проведенных исследований, сформулирована цель и задачи, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Приведены основные положения, выносимые на защиту, отмечена степень достоверности результатов и отражен личный вклад автора.

В обзоре литературы (глава 1) приведены данные по проанализированным научным публикациям по диссертационной теме. Описаны особенности биопленок формируемых условно патогенными микроорганизмами *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Описаны механизмы

формирования устойчивости биопленок к антибиотикам. Приведены различные стратегии разрушения биопленок с целью эрадикации возбудителей. Подробно описан лектин LecA *P. aeruginosa*, который является мишенью для разработки соединений – ингибиторов образования биопленок. Показано его роль в формировании биопленки и возможности его подавления. Также описана возможность ферментативного разрушения биопленки *S. aureus*.

Во второй главе «Материалы и Методы» представлены бактериальные штаммы, реактивы и методы, использованные при выполнении исследования.

В главе 3 «Результаты» приведены экспериментальные данные. В первой части главы 3 описано получение рекомбинантного белка LecA и приведены данные по взаимодействию с ним исследуемых олиго- и полисахаридов. Далее описано тестирование отобранного полисахарида галактозы с биопленкой *P. aeruginosa*. Во второй части главы 3 приведены данные о получении химерного рекомбинантного белка, состоящего из слитых последовательностей лизоцифа и дисперсина В и его тестировании на способность разрушать биопленку *S. aureus*.

В главе 4 «Обсуждение результатов» полученные автором результаты интерпретированы с данными современной научной литературы.

В Заключении представлено обобщение сделанных экспериментальных наблюдений.

Выводы и положения диссертации соответствуют полученным результатам, научно доказаны и соответствуют цели и задачам работы.

Общие замечания по диссертационной работе

- 1) Для лучшего восприятия материала автору следовало разделить главу 3 «Результаты» на две части, разделив исследования, посвященные биопленкам *P. aeruginosa* и *S. aureus*.
- 2) В п. 3.1 «Клонирование, наработка и выделение LecA» следовало более подробно описать процесс получения генно-инженерной конструкции и представить ее схему. В описании к рисункам 9 и 10 не приведены молекулярные массы полученных белковых продуктов.
- 3) Интерес вызывает получение химерного рекомбинантного белка, состоящего из слитых последовательностей лизоцифа и дисперсина В. Однако в работе не описана схема клонирования и не приведен иллюстративный материал, подтверждающий получение рекомбинантного белка.

Приведенные замечания не умаляют ценность диссертационного исследования.

По существу, замечаний к оформлению диссертации нет.

Заключение

Таким образом, диссертация Гришина А.В. на тему «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизоцифа и дисперсина В на биопленки возбудителей оппортунистических инфекций»,

является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальных научных задач – исследование природных полисахаридов и антибактериальных ферментов, влияющих на биопленки возбудителей оппортунистических инфекций. Полученные автором результаты имеют существенное значение для развития медицинской микробиологии и биоинженерии.

Диссертация Гришина А.В. на тему «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизоцифина и дисперсина В на биопленки возбудителей оппортунистических инфекций» соответствует требованиям, установленным в пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №№842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №650 от 29.05.2017 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; № 426 от 20.03.2021 г.; №101 от 26.01.2023 г.; с изменениями в действующей ред. №62 от 25.01.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 – Микробиология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании Ученого совета ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол №5 от 22 октября 2024 г.).

Заведующий лабораторией протективных антигенов,
руководитель научного направления по иммунобиотехнологии
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова
доктор медицинских наук, профессор

 Н.А. Михайлова

Подпись Михайловой Н.А. заверяю:
Ученый секретарь ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова

 А.В. Васильева

«21» ноября 2024 г.