

ОТЗЫВ

Официального оппонента, кандидата биологических наук Плюта Владимира Александровича на диссертацию Гришина Александра Владимировича «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».

Работа А.В. Гришина посвящена исследованию бактериальных биоплёнок и поиску новых средств борьбы с ними. В диссертационной работе исследовались два подхода к борьбе с биоплёнками: 1) блокирование белков-лектинов природными олиго- и полисахаридами и 2) разрушение бактериальных клеток и полисахаридов матрикса рекомбинантными белками-ферментами. Выявление закономерностей при действии на биоплёнку соединений различной природы является важным как в фундаментальном, так и в прикладном отношении.

Актуальность темы исследования. Согласно современным представлениям, в естественных условиях бактерии в большинстве случаев существуют в форме биоплёнок – сообществ бактериальных клеток, окруженных матриксом. Из-за повсеместной распространенности, а также значительно более высокой толерантности к неблагоприятным условиям среды и антимикробным агентам по сравнению с планктонными клетками, бактериальные биоплёнки представляются крайне важным объектом для изучения, а разработка средств, позволяющих управлять их формированием и разрушением, имеет большое практическое значение. Это особенно справедливо в отношении биоплёнок оппортунистических патогенов, поскольку образование биоплёнок патогенными бактериями часто является причиной неэффективности антибактериальной терапии и развития хронических инфекций. В связи с этим актуальность диссертационной работы, посвященной исследованию двух разных подходов к борьбе с биоплёнками оппортунистических патогенов, не подлежит сомнению.

Научная новизна исследования. Диссертационная работа состоит из двух частей. Первая часть посвящена исследованию олиго- и полисахаридов растительного происхождения и их взаимодействиям с секретлируемым белком лектином LecA и биоплёнками *Pseudomonas aeruginosa*. Автором работы впервые изучены параметры взаимодействия олигосахаридов галактозил-маннотриозы, дигалактозил-маннопентаозы и вербаскозы с лектином LecA, входящим в состав матрикса биоплёнок *P. aeruginosa*, и протестирована способность одного из этих олигосахаридов подавлять формирование биоплёнок. Также впервые исследовано влияние полисахарида галактана на образование и разрушение биоплёнок *P. aeruginosa*. Ранее взаимодействие этого полисахарида с бактериальными биоплёнками не изучалось. В работе продемонстрирована способность галактана защищать бактерии внутри биоплёнки от антибиотиков ципрофлоксацина и амикацина при совместном использовании, и подавлять образование биоплёнок при его использовании в отсутствие антибиотиков. Подобный эффект не был описан в литературе и продемонстрирован впервые. Вторая часть работы, посвященная влиянию рекомбинантных ферментов на биоплёнки *Staphylococcus aureus*, содержит как уже описанные в литературе результаты, так и новые наблюдения. Так, эффективность

ферментов лизоцифина и дисперсина В в отношении биоплёнок *S. aureus* была описана ранее. При этом их совместное действие до сих пор не изучалось. Также новым является химерный белок Lst-DspB, состоящий из лизоцифина и дисперсина В, и представленные в работе данные о его активности в отношении биоплёнок *S. aureus*. Наконец, использование лизоцифина для придания антибактериальных свойств биокерамике также не было описано в литературе и является новым.

Научная и практическая значимость работы.

Несомненной практической значимостью обладают результаты, показывающие повышение эффективности химерного белка, состоящего из лизоцифина и дисперсина В, против биоплёнок *S. aureus*. С одной стороны, полученный белок может быть напрямую использован для разработки на его основе новых антибактериальных средств. С другой стороны, полученные результаты демонстрируют перспективность соединения в одном белке ферментов, гидролизующих пептидогликан бактериальной клеточной стенки и полимеры биоплёночного матрикса. Подобные химерные белки могут быть созданы с использованием не только лизоцифина и дисперсина В, но и других аналогичных ферментов. Также практическое применение может иметь диопсид с адсорбированным лизоцифином. В работе показано, что такой материал обладает выраженными антибактериальными и антибиоплёночными свойствами, что, несомненно, является положительным качеством для костно-пластических материалов. Описанные в работе растительные олиго- и полисахариды, очевидно, не могут быть напрямую применены для разработки на их основе средств для борьбы с бактериальными биоплёнками. Тем не менее, эти результаты обладают определенной научной значимостью, поскольку показывают, что, по крайней мере, для некоторых классов соединений, способность подавлять формирование биоплёнок и разрушать сформированные биоплёнки не означает, что такие соединения будут повышать эффективность антибактериальной терапии, и разработка новых антибактериальных средств на основе полисахаридов требует более осторожного подхода.

Структура диссертации.

Диссертационная работа выстроена по стандартному образцу и включает в себя обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, обсуждение и заключение. Обзор литературы является достаточно подробным и включает в себя общее описание бактериальных биоплёнок, характеристику использованных в данной работе микроорганизмов и особенности структуры и регуляции образования биоплёнок этими микроорганизмами, после чего затрагивает проблему толерантности бактериальных биоплёнок к применяемым в клинической практике антибиотикам. Далее в обзоре литературы приводится перечисление различных подходов к борьбе с бактериальными биоплёнками, из которых подробно освещаются соединения – блокаторы лектина LecA, олиго- и полисахариды, и ферменты, обладающие антимикробным или противобиоплёночным действием.

В главе 2 «Материалы и методы» приводится детальное описание использованных в данной работе методик, включающих как стандартные для данной области исследований подходы, так и их оригинальные модификации. Для получения рекомбинантных белков LecA, лизоцифина, дисперсина В и слитного белка Lst-DspB использовались стандартные методы генной инженерии и хроматографической очистки белков с помощью никель-хелатной и катионообменной видов хроматографии. Биохимические и физико-химические

методы (микрокалориметрия) использовались для определения каталитической активности рекомбинантных ферментов и аффинности исследуемых олигосахаридов к лектину LecA. Метод иммуноферментного анализа (ИФА) применялся для определения кинетики выхода адсорбированного лизостафина с порошка диопсида. Основная же часть работы выполнена при помощи микробиологических методов: определение минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентраций; культивирование биоплёнок в стационарных условиях в 96-луночных планшетах, на Calgary Biofilm Device и на полипропиленовых купонах; определение общей биомассы с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым; определение количества жизнеспособных клеток за счет высева на твердые питательные среды; светлопольная и флуоресцентная микроскопия и др. Результаты экспериментов подвергались статистической обработке с использованием стандартных критериев (критерий Стьюдента, критерий Манна-Уитни).

В главе 3 «Результаты», содержащем 17 подразделов, представлены собственно результаты исследования. В разделе 3.1 описывается процедура получения рекомбинантного лектина LecA, используемого в разделе 3.2 для исследования его взаимодействий с олигосахаридами. Способность олигосахаридов связываться с LecA демонстрируется с помощью двух принципиально отличных методов: гемагглютинации и микрокалориметрии. На основании полученных данных делается вывод о том, что олигосахарид дигалактозил-маннопентаоза, содержащий два остатка галактозы и имеющий наиболее высокую аффинность к LecA, является наиболее перспективным олигосахаридом для последующего тестирования на модели образования биоплёнок *P. aeruginosa*. В разделе 3.3 приводятся результаты такого тестирования, показывающие, что, несмотря на относительно высокую аффинность дигалактозил-маннопентаозы к LecA и известную из многочисленных литературных данных способность блокаторов LecA подавлять образование биоплёнок *P. aeruginosa*, этот олигосахарид не оказывал негативного влияния на биоплёнки исследуемых штаммов. В разделе 3.4 описывается испытание панели полисахаридов на способность ингибировать образование биоплёнок *P. aeruginosa*, что позволило выделить галактан как наиболее перспективный полисахарид для дальнейшего изучения. Разделы 3.5-3.9 содержат более детальное описание характера взаимодействия галактана с биоплёнками и планктонными клетками *P. aeruginosa*, в частности, демонстрируется способность галактана подавлять образование биоплёнок при использовании в высоких концентрациях и, наоборот, стимулировать формирование биоплёнок в низких концентрациях; исследуется взаимодействие галактана с предварительно сформированными биоплёнками *P. aeruginosa*; показывается отсутствие негативного влияния галактана на планктонные клетки, благодаря чему делается вывод о специфическом воздействии галактана именно на биоплёнки, и, наконец, исследуется совместное действие галактана и небольшой панели антибиотиков. Эти результаты демонстрируют неожиданный эффект, благодаря которому при определенном сочетании галактана и некоторых антибиотиков (в частности, амикацина) наблюдается повышенная выживаемость бактерий внутри биоплёнки по сравнению с применением только антибиотика. В разделе 3.10 дополнительно приводятся данные о влиянии галактана на формирования биоплёнок двумя другими видами микроорганизмов (*Burkholderia cenocepacia* и *Stenotrophomonas maltophilia*). Разделы 3.11-3.15 посвящены биоплёнкам *S. aureus* и рекомбинантным ферментам лизостафину (Lst) и дисперсину В (DspB), а также химерному белку Lst-DspB, в котором последовательности этих белков соединены через

небольшой глицин-сериновый линкер. С помощью синтетических субстратов показывается, что химерный белок сохраняет оба типа каталитической активности (пептидазную активность лизостафина и гликозид-гидролазную активность дисперсина В) на уровне исходных ферментов, но обладает сниженной способностью лизировать клетки стафилококка. Автор связывает это с увеличением молекулярной массы химерного белка по сравнению с лизостафином. В разделе 3.15 исследуется действие рекомбинантных ферментов на биоплёнки *S. aureus*. Интересным представляется тот факт, что как лизостафин, так и дисперсин В по-разному действуют на биоплёнки *S. aureus*, выращенные в разных условиях (в присутствии плазмы крови и без нее). Кроме того, полученные результаты демонстрируют более высокую способность химерного белка разрушать биоплёнки *S. aureus* по сравнению со смесью лизостафина и дисперсина В. Таким образом, соединение этих двух ферментов в одном белке приводит к повышению антибиоплёночной активности химерного белка Lst-DspB. Наконец, в разделах 3.16-3.17 описывается адсорбция лизостафина на частицы кальций-магниево-силикатной керамики диопсида, и изучаются антибактериальные свойства такой керамики. Использованный в данной работе порошок диопсида оказался способен адсорбировать порядка 5 мкг лизостафина на 1 мг диопсида, что представляется небольшим количеством, однако этого количества хватило для придания диопсиду антибактериальных свойств и способности разрушать биоплёнки *S. aureus*.

В главе 4 «Обсуждение результатов» полученные результаты сопоставляются с литературными данными, а также приводятся возможные объяснения наблюдаемым эффектам.

Диссертационная работа завершается Заключением, в котором автор делает вывод о том, что на настоящий момент рекомбинантные ферменты представляются более перспективным направлением в борьбе с биоплёнками по сравнению с олиго- и полисахаридами.

Многие результаты, описанные в работе, получены автором впервые, они вносят вклад в понимания закономерностей образования биоплёнок и функций её отдельных компонентов. Результаты диссертационной работы открывают новые перспективы изучения закономерностей образования биопленок бактерий, а также разработки методов контроля и борьбы с биопленками. Кроме того, эти данные могут быть использованы в прикладных целях в медицине и сельском хозяйстве.

Результаты работы опубликованы в 5 научных статьях, а также представлены в докладах на всероссийских и международных научных конференциях. Автореферат и опубликованные по теме диссертации научные работы соответствуют содержанию диссертации.

Вопросы и замечания.

К диссертационной работе имеется несколько вопросов:

1) Каков был выход рекомбинантных белков (лизостафина, дисперсина В и химерного белка Lst-DspB) в полученных бактериальных системах?

2) Известно ли что-либо автору о влиянии растительных олигосахаридов и/или полисахаридов на биоплёнки бактерий «полезных» для человека, например об их влиянии на бактерии стимулирующие рост растений или на промышленные штаммы продуценты ферментов, витаминов и др. веществ?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на обоснованность

приведенной в диссертации аргументации и на положительную оценку исследования в целом.

Имеются некоторые замечания относительно наличия в диссертации и автореферате досадных опечаток и лишних фраз, что несколько диссонирует с хорошо выдержанным стилем изложения и оформления работы. Однако эти небольшие замечания несколько не умаляют значимости диссертационного исследования.

Заключение.

Диссертационная работа Гришина А.В. «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизоцифина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием. По актуальности темы, научной и практической значимости, методологическому объему и достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Гришина А.В. соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с актуальными изменениями и дополнениями), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор работы Гришин Александр Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук

(03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

и 03.02.03 – «Микробиология»),

научный сотрудник

лаборатории функциональной энзимологии

отдела молекулярной фармакологии и иммунологии

Курчатовского комплекса

НБИКС-природоподобных технологий

НИЦ «Курчатовский институт»

Плюта Владимир Александрович

123182, Москва,

площадь академика И.В. Курчатова, д. 2 стр. 1

Тел.: 7(903) 516-63-14

e-mail: plyutaba@gmail.com

Подпись Плюта В.А. заверяю:

Первый заместитель директора Центра по науке

НИЦ «Курчатовский институт»

Дьякова Юлия Алексеевна



/Дьякова Ю.А./

18 ноября 2024 г.