

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу

Гришина Александра Владимировича

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

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология

Актуальность исследований. В настоящее время исследование биопленок является одним из приоритетных направлений современной микробиологии. Особенно важными представляются исследования биопленок, формируемых микроорганизмами в организме человека и связанных со многими патологическими процессами, часто принимающими хронические формы и трудно поддающиеся лечению.

Высокая устойчивость бактерий в составе биопленок обуславливается многими факторами, в том числе резистентностью самих клеток, наличием персистеров, а также многочисленными защитными функциями экзополимерного матрикса. Вот почему для полной эрадикации биопленок необходимы подходы, отличающиеся от методов воздействия на планктонные клетки. Такие подходы должны включать не только эрадикацию самих клеток патогена, но и дезорганизацию матрикса, приводящую к высвобождению клеток и их большей доступности для антибактериальных препаратов. Не менее важным подходом являются методы, предотвращающие образование биопленок как на биотических, так и абиотических поверхностях.

В связи с этим разработка методов и подходов к ингибированию образования новых или разрушению уже сформировавшихся биопленок, сопровождающихся гибелью клеток, является чрезвычайно актуальной задачей как в теоретических, так и практических аспектах.

В связи с этим **цель работы** – испытание природных олиго- и полисахаридов в качестве соединений, блокирующих функции лектина LecA, исследование их действия на биоплёнки *P. aeruginosa*, а также изучение действия ферментов лизоцифа и дисперсина В и их комбинации на биоплёнки *S. aureus* представляется вполне актуальной.

Для достижения этой цели диссертантом были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать способность растительных олиго- и полисахаридов, содержащих остатки галактозы, взаимодействовать с лектином LecA.
2. Исследовать влияние олиго- и полисахаридов, показавших способность взаимодействовать с LecA, на формирование и разрушение биопленок *P. aeruginosa*.
3. Исследовать действие олиго- и полисахаридов, показавших эффективность в отношении биопленок *P. aeruginosa*, в комбинации с некоторыми антибиотиками.
4. Исследовать совместное действие лизоцифа и дисперсина В на биоплёнки *S. aureus* в сравнении с действием каждого из белков по-отдельности.
5. Исследовать эффективность химерного белка, состоящего из лизоцифа и дисперсина В, в отношении биопленок *S. aureus* в сравнении с простой смесью исходных белков.
6. Исследовать возможность введения лизоцифа и дисперсина В в костно-пластический материал диопсид для придания ему антибиопленочных свойств.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Обоснованность научных положений, результатов, выводов и рекомендаций основывается на тщательной проработке теоретических основ изучаемой проблемы и анализе собственных экспериментальных данных, включающем статистическую обработку.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа Гришина А.В. выполнена на хорошем методическом уровне с использованием современных методов и приборов и достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Гришиным А.В. впервые

- показана способность растительных олигосахаридов – вербаскосы, галактозил-маннотриозы и дигалактозил-маннопентозы, а также полисахарида галактана взаимодействовать с лектином А (LecA) *P. aeruginosa*;
- показано дозозависимое действие галактана на биопленки: антибиопленочное – при высоких концентрациях и стимулирующее – при низких;
- показана более высокая бактериолитическая эффективность химерного белка (димер лизостафина и гликозидгидролазы) по сравнению с действием простой смеси исходных белков.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в описании новых, не наблюдавшихся ранее эффектов, оказываемых полисахаридами на бактериальные биоплёнки *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

Показано моделирующее, в зависимости от рабочей концентрации, действие полисахаридов и, в частности, галактана, на формирование биопленки *P. aeruginosa*, что имеет важное значение при разработке средств борьбы с биопленками патогенных бактерий.

Кроме того, предложен и разработан новый вариант методики культивирования биоплёнок *P. aeruginosa* на полипропиленовых купонах. Такая методика дает возможность анализировать рост биопленок с помощью светлопольной или флуоресцентной микроскопии непосредственно на купонах.

На биопленках *S. aureus* продемонстрирована повышенная эффективность действия химерного белка, одновременно обладающего бактериолитической (лизостафин) и гликозидгидролазной активностями (дисперсин В). Эти данные могут быть использованы при разработке средств для борьбы с биоплёнками *S. aureus* на основе белков-ферментов.

Краткая характеристика основного содержания диссертации. Диссертационная работа изложена на 197 страницах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы (303 источника). Работа содержит 6 таблиц и 52 рисунка.

Во «**Введении**» автор кратко описывает существующую научную проблему, актуализирует тему исследования, обосновывает цель и основные направления ее реализации, формулирует основные положения, выносимые на защиту.

В «**Обзоре литературы**» описаны основные темы исследований, обозначенные в названии диссертации: понятие биопленки, в том числе характеристики биопленок *P. aeruginosa* и *S. aureus*, устойчивость биопленок к антибиотикам и стратегии борьбы с биопленками. Отдельное внимание уделено LecA *P. aeruginosa*, его функциям и воздействиям на него различных углеводсодержащих соединений в качестве блокаторов, а также бактериальным лизинам и ферментам, разрушающим матрикс биопленок *S. aureus*.

В «**Материалах и методах**» представлены микробиологические, микроскопические, генетические, иммунологические, биохимические, физико-химические

методы и методы статистической обработки данных. Всего 22 метода, в том числе и методы, включающие новые подходы, разработанные автором диссертации.

Главу «**Результаты**» можно разделить на две смысловые части. Первая часть включает эксперименты с галактозсодержащими соединениями, их способностью связываться с LecA и оказывать влияние на биопленки *P. aeruginosa*. Логично, что она начинается с тестирования средства ряда олиго- и полисахаридов (содержащих концевые невосстанавливающие остатки галактозы) к лектину А.

Дальнейшие исследования проводились с галактаном картофеля, который показал наибольшее сродство к лектину А. В работе использовали два штамма, лабораторный *P. aeruginosa* PAO1 и клинический изолят 216.

Для чистоты эксперимента диссертантом была исключена возможность бактерицидного или бактериостатического действия галактана на планктонные клетки *P. aeruginosa*, а также ингибирующего действия других полисахаридов (не содержащих галактозу), например, глюкана, на формирование биопленки обоими штаммами.

Следующий раздел диссертации посвящен изучению совместного действия галактана и антибиотиков.

Исходя из современных подходов к методам эрадикации биопленок, часто требующих применения более одного агента, ингибирующее действие галактана на образование биопленок и на уже сформированные биопленки было изучено совместно с действием трех антибиотиков – цефтазидима, ципрофлоксацина и амикацина. Все три выбранных антибиотика используют в клинической практике для лечения инфекций, вызванных *P. aeruginosa*. Влияние антибиотиков проверяли как на планктонных клетках, так и на биопленках, причем в случае биопленок определяли МКЭБ.

В этой серии экспериментов интересными представляются данные о повышенной жизнеспособности клеток в биопленках, выращенных в присутствии галактана и амикацина, в сравнении с клетками, обработанными только амикацином.

Также следует отметить моделирующее действие галактана, зависящее от концентрации, на биопленки обоих штаммов *P. aeruginosa*, приводящее как к ингибированию, так и стимулированию образования биопленок.

Вторая часть результатов посвящена изучению антибиопленочной активности двух ферментов, лизостафина (антибактериального лизина) и дисперсина В (фермента, гидролизующего полисахариды матрикса биопленок), на биопленки *S. aureus*.

Для усиления антибиопленочного действия методами генной инженерии оба фермента были соединены в один химерный белок, проявляющий литическую активность в отношении пептидогликана и гликозилгидролазную – в отношении полисахарида PNAG матрикса биопленки *S. aureus*. Полученный химерный белок показал повышенную антибиопленочную активность по сравнению с активностью каждого отдельного белка, а также по сравнению с простой смесью этих белков.

Интересными и перспективными в плане практического использования представляются результаты о способности диопсида, кальций-магниевой силикатной керамики, необратимо сорбировать лизостафин. Такой материал, предназначенный для костной пластики, может предотвращать развитие имплант-ассоциированных инфекций, часто вызываемых штаммами *S. aureus*.

Очень хорошо написана глава «**Обсуждение**», в которой автор обосновывает логику проведения экспериментов, интерпретирует полученные результаты, высказывает свои предположения.

Завершается диссертационное исследование «**Заключением**» и «**Выводами**».

Выводы обобщают результаты проведенных экспериментов и полностью соответствуют поставленным задачам.

Диссертация Гришина А.В. производит хорошее впечатление и легко читается. Материал работы хорошо структурирован, изложен последовательно, логично, содержит информативные графики, диаграммы и фотографии. В качестве достоинств оформления диссертации хотелось бы отметить исчерпывающие подписи к рисункам и наличие небольших заключений в конце глав.

Автореферат изложен на 24 страницах и его содержание полностью отражает основные положения диссертации. Выводы в автореферате и диссертации идентичны.

Результаты исследований опубликованы автором в 5 печатных работах (в четырех Гришин А.В. является первым автором) и представлены на пяти российских и международных конференциях.

Замечания и пожелания. Как и любая объемная работа, диссертация Гришина А.В. содержит ряд замечаний.

1. В автореферате нет списка сокращений.
2. В списке сокращений в диссертации многие сокращения даны только в английской транскрипции; в «Методах» не приведен состав среды M63, а состав среды LB приведен только после пятого упоминания в тексте; не объяснено понятие «панели» антибиотиков или «панели» коммерческих полисахаридов, «эффект инокулюма», таргетирование, стоковый раствор.
3. В работе есть опечатки и неточные выражения (например, маннопентаоза вместо маннопентоза), неточные выражения, например, методики культивации биоплёнок *P. aeruginosa* (лучше говорить методики культивирования);
4. «Основным компонентом матрикса биоплёнок *S. aureus* считается полисахарид поли-β-1-6-N-ацетилглюкозамин (PNAG, также называемый polysaccharide intercellular adhesin или PIA)». Это разные полисахариды.
5. В таблице 1 отсутствуют ссылки, а в таблице 2 – многие клетки – пустые.
6. Нет единообразия в терминологии димера «лизостафин/дисперсин В»: он обозначается и как слитный белок, и как химерный белок. Второй термин, на мой взгляд, более точный...

При прочтении работы возникли некоторые вопросы, которые хотелось бы задать диссертанту.

1. В работе использовали два штамма *P. aeruginosa* лабораторный и клинический изолят. При этом клинический изолят охарактеризован не был, также не была указана мотивация использования клинического изолята, а полученные результаты отдельно не обсуждались.
2. Почему для проверки способности подавлять образование биопленки галактаном были выбраны *Stenotrophomonas maltophilia* и *B. cenocepacia*. Содержат ли они лектин А?
3. Как можно объяснить тот факт, что обработка сформированных биоплёнок лабораторного штамма галактаном частично разрушает их, в то время как влияние галактана на сформированные биоплёнки изолята 216 практически не заметно.
4. Можно ли объяснить повышенную жизнеспособность клеток в биопленке *P. aeruginosa*, выращенную в присутствии галактана и амикацина, образованием

галактановой «капсулы», окружающей и защищающей клетку от действия антибиотика?

Высказанные замечания не снижают общей высокой оценки работы, не умаляют значимости полученных результатов и не меняют основные выводы, сформулированные в диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Гришина Александра Владимировича является законченной научно-квалификационной работой, которая по актуальности темы, адекватности использованных методов, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов соответствует паспорту специальности 1.5.11. – Микробиология и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а именно: пп. 9-11, 13 и 14, раздела II «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление правительства РФ 842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 25.01.2024 г)), а сам автор, Гришин Александр Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории физиологии и биохимии микробов
каф. микробиологии
Биологического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова
доктор биологических наук

Потехина Наталья Викторовна

Адрес: 119234, Россия, Москва,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»,
Биологический факультет.
Тел.: 8 963 921 26 07,
e-mail: potekhina56@mail.ru

Дата составления отзыва: 21.11.2024г

Зам. декана по научной работе
биологического ф-та МГУ
имени М.В. Ломоносова
доктор биологических наук

Рубов Александр Михайлович



Гайдарова Н.В.

Биологического факультета МГУ

