

УТВЕРЖДАЮ:  
Директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,  
д.б.н., академик РАН  
Гинцбург Александр Леонидович

\_\_\_\_\_ 2024 г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по диссертационной работе Гришин Александра Владимировича, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Диссертация «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций» выполнена на базе лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В период подготовки диссертации соискатель Гришин Александр Владимирович работал в должности младшего научного сотрудника и должности научного сотрудника в лаборатории биологически активных наноструктур.

В 2009 г. Гришин А. В. Закончил специалитет агрономического факультета РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева по специальности «Селекция и генетика сельскохозяйственных культур» со специализацией «Биотехнология».

С 1 октября 2009 г. по 1 октября 2012 года обучался в очной аспирантуре факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

Карягина-Жулина Анна Станиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

**Оценка выполненной соискателем работы.** В ходе выполнения диссертационной работы соискателем получены новые данные о действии полисахарида галактана на биоплёнку *Pseudomonas aeruginosa*, в том числе описан не наблюдавшийся ранее эффект снижения эффективности некоторых антибиотиков на бактериальные биоплёнки при их применении совместно с полисахаридом, который в отсутствие антибиотиков подавляет образование биоплёнок. Кроме того, получены данные о совместном действии



рекомбинантных ферментов лизоцина и дисперсина В на биоплёнки *Staphylococcus aureus*, в том числе в составе слитного белка, а также данные о возможности иммобилизации лизоцина и дисперсина В на некоторых костно-пластических материалах. Диссертационная работа «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизоцина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций» представляет собой научное исследование, выполненное на должном уровне, и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук.

**Актуальность.** Биоплёнки – сообщества микроорганизмов, окруженных внеклеточным полимерным матриксом, - являются доминирующей формой существования бактерий. Формирование патогенными и условно-патогенными (оппортунистическими) бактериями биоплёнок часто является причиной неэффективности стандартной антибиотикотерапии и невозможности полной эрадикации патогена, что в свою очередь приводит к переходу инфекции в хроническую форму или диссеминации бактерий по организму и генерализации инфекции. В настоящее время большое количество исследований сосредоточены на поиске новых средств для борьбы с бактериальными биоплёнками, принципиально отличающимися по механизму действия от традиционных антибиотиков. Такие соединения могут быть направлены на дисперсию биоплёнки и применяться в сочетании с бактерицидными антибиотиками, либо непосредственно обладать антибактериальным эффектом в отношении бактериальных клеток внутри биоплёнки. В диссертационной работе изучается воздействие на бактериальные биоплёнки некоторых растительных олиго- и полисахаридов, а также рекомбинантных ферментов, обладающих как бактерицидным, так и исключительно антибиоплёночным действием. Олиго- и полисахариды представляются привлекательным классом антибиоплёночных соединений, поскольку, как правило, обладают высокой стабильностью, достаточно дешевы в получении и нетоксичны. К настоящему моменту уже описано достаточно большое количество полисахаридов, способных ингибировать образование бактериальных биоплёнок или разрушать уже сформированные биоплёнки, однако понимание многих аспектов их активности до сих пор ограничено, а совместное действие полисахаридов и традиционных антибиотиков изучено лишь в редких случаях. В связи с этим поиск новых олиго- и полисахаридов, обладающих антибиоплёночными свойствами, и их детальное исследование, представляют несомненный интерес. Антибактериальные и антибиоплёночные ферменты также являются актуальным направлением исследований, которому посвящено множество научных работ. К первым относятся антибактериальные лизины, гидролизующие пептидогликан клеточной стенки бактерий, что приводит к их осмотическому лизису и гибели. Ко вторым относятся различные протеазы, нуклеазы и гликозидгидролазы, расщепляющие молекулы полимерного матрикса, что влечет за собой дисперсию биоплёнки и переход бактериальных клеток в планктонную форму. Особый интерес представляет собой комбинирование двух типов ферментов для одновременного воздействия на матрикс биоплёнок и бактериальные клетки. Имеющиеся работы показывают, что такое комбинирование приводит к синергическому эффекту. При этом на настоящий момент не существует работ, в которых разные типы ферментов объединялись бы в составе одного слитного белка. Учитывая вышеизложенное, актуальность диссертационной работы Гришина А. В. не вызывает сомнений.



Диссертационная работа является частью исследований, проводимых в рамках Госзадания Минздрава России (№ 115030470038) и гранта Российского Научного Фонда (№ 18-15-00235).

**Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации.** При выполнении диссертационной работы Гришин А. В. проявил себя как квалифицированный специалист, способный анализировать научную литературу, самостоятельно осваивать новые экспериментальные методики, планировать и проводить научные эксперименты, анализировать и критически оценивать полученные результаты, в том числе с использованием современных компьютерных программ. Основная часть результатов получена автором лично. Кроме того, соискатель лично подготовил результаты работы к публикации в рецензируемых научных журналах и их представлении на научных конференциях. В диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов или отдельных результатов, указывает о результатах, полученных в соавторстве, в чем соблюдается пункт 14 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01.10.2018) «О порядке присуждения ученых степеней».

**Степень достоверности результатов проведенных исследований.** Полученные Гришиным А. В. результаты представительны и достоверны. Используемые в исследовании методики корректны. Выводы диссертационной работы обоснованы и согласуются с полученными результатами.

**Новизна и практическая значимость диссертации.** В работе впервые описано взаимодействие растительных олигосахаридов вербаскозы, галактозил-маннотриозы и дигалактозил-маннопентаозы, а также полисахарида галактана, с лектином LecA и биоплёнками *P. aeruginosa*. Некоторые из обнаруженных в ходе исследования эффектов являются новыми и до сих пор не были описаны в литературе. В частности, в работе показано, что полисахарид галактан способен ингибировать образование биоплёнок *P. aeruginosa* и частично разрушать сформированные биоплёнки, однако при совместном применении с некоторыми антибиотиками защищает бактерии в составе биоплёнки от их бактерицидного действия. Схожий эффект ранее был описан только для белка *A. S. aureus* в отношении биоплёнок *P. aeruginosa*, но не для полисахаридов.

Другим несомненно новым результатом данной работы является получение и описание слитного белка, сочетающего в себе бактериолитическую активность лизостафина и гликозидгидролазную активность дисперсина В, и таким образом действующего одновременно на матрикс биоплёнок *S. aureus* и на бактериальные клетки в составе биоплёнки. Показано, что несмотря на сниженную антибактериальную активность по сравнению с нативным лизостафином, слитный белок более эффективен в отношении биоплёнок *S. aureus*, чем оба исходных белка (лизостафин и дисперсин В), а также их смесь. Подобный результат имеет также и практическую значимость, поскольку показывает на перспективность комбинирования антибактериальных лизинов и ферментов, разрушающих компоненты матрикса биоплёнок, в составе слитных белков. Кроме того, полученный слитный белок может быть непосредственно использован для разработки на его основе средств для борьбы с биоплёнками *S. aureus*.

**Ценность научных работ соискателя.** Результаты, опубликованные в научных работах соискателя, расширяют представление о возможных эффектах различных



полисахаридов на бактериальные биоплёнки. В литературе описано достаточно большое количество полисахаридов, влияющих на образование биоплёнок, либо разрушающих или частично разрушающих сформированные биоплёнки, действующих на биоплёнки относительно широкого спектра бактерий или только отдельных видов, изменяющих поверхностные свойства бактерий или не влияющих на них, и т.д. Однако до сих пор не было описано полисахаридов, которые с одной стороны, обладали антибиоплёночным эффектом, а с другой стороны – защищали бактерии внутри биоплёнки от антибиотиков. Наблюдение подобного эффекта подчеркивает потенциально сложный и трудно предсказуемый характер взаимодействия полисахаридов с бактериальными биоплёнками, что необходимо учитывать при разработке антибиоплёночных средств на основе полисахаридов.

Результаты, полученные соискателем, подтверждают перспективность сочетанного применения смеси ферментов, один из которых направлен на лизис бактериальных клеток, а второй – на разрушение полимерного матрикса биоплёнок. Кроме того, соискателем показано, что совмещение этих двух функций в рамках одного слитного рекомбинантного белка позволяет получить еще более выраженный антибиоплёночный эффект. Разработанный в рамках проведенного исследования слитный белок может быть использован для разработки на его основе средств для терапии инфекций, связанных с образованием биоплёнок золотистым стафилококком. Примером такой инфекции может быть остеомиелит, основным возбудителем которого является именно золотистый стафилококк, а эффективность стандартной антибиотикотерапии невелика.

**Специальность, которой соответствует диссертация.** Диссертационная работа соответствует п. 15 «Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки» паспорта специальности 1.5.11 Микробиология, отрасль науки – Биологические науки.

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем.** Соискатель имеет 10 печатных научных работ по теме диссертация, из которых 5 – статьи в изданиях, входящих в международные системы научного цитирования Scopus и Web of Science (International Journal of Antimicrobial Agents, Acta Naturae, Биохимия, Critical Reviews in Microbiology, Pathogens). Результаты исследований доложены на всероссийских и международных конференциях. Работы, опубликованные по представленной теме:

1. Grishin A., Karyagina A. S., Tiganova I. G., Dobrynina O. Y., Bolshakova T. N., Boksha I. S., Alexeyeva N. V., Stepanova T. V., Lunin V. G., Chuchalin A. G., Ginzburg A. L. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by LecA-binding polysaccharides // Int. J. Antimicrob. Agents. 2013. V. 42. № 5. P. 471–472. (Q1, IF 10.8)

2. Гришин А. В., Кривоzubов М. С., Карягина А. С., Гинцбург А. Л. Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений // Acta Naturae. 2015. Т. 7. № 2. С. 43–56. (Q3, IF 2.0)

3. Гришин А. В., Карягина А. С. Полисахарид галактан подавляет образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa*, но защищает сформированные биоплёнки от действия антибиотиков // Биохимия. 2019. Т. 84. № 5. С. 668–681. (Q2, IF 2.8)

4. Grishin A. V., Karyagina A. S., Vasina D. V., Vasina I. V., Gushchin V. A., Lunin V. G. Resistance to peptidoglycan-degrading enzymes // Critical Reviews in Microbiology. 2020. V. 46. № 6. P. 703-726. (Q1, IF 6.5)

5. Kudinova A., Grishin A., Grunina T., Poponova M., Bulygina I., Gromova M., Choudhary R., Senatov F., Karyagina A. Antibacterial and anti-biofilm properties of diopside powder loaded with lysostaphin // Pathogens. 2023. V. 12. № 2. 177. (Q2, IF 3.7)

Диссертация «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций» Гришина Александра Владимировича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Заключение принято на научной конференции отдела генетики и молекулярной биологии бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Присутствовало 28 чел. Результаты голосования: «за» - 28 чел., «против» - 0 чел., «воздержались» - 0 чел. Протокол № 6/26 от 17 апреля 2024 г.

Председатель научной конференции, д.б.н.,  
Зав. лаб. молекулярной биотехнологии

Шмаров М.М.

Секретарь научной конференции, д.б.н.,

Большакова Т.Н.

