

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ремизова Евгения Кирилловича на тему: «Разработка способа получения пептидов, выделенных из личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica* и изучение их биологических свойств», представленную на соискание учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Актуальность темы диссертационной работы.

Значительные темпы роста устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к противомикробным препаратам (Roth N. et al., 2019; Smith H.Z., Kendall B., 2020) являются естественным биологическим ответом на использование антибиотиков, создающих селективное давление, способствующее отбору, выживанию и размножению резистентных штаммов микроорганизмов (Imperial I.C., Ibane J.A., 2016; Płusa T. et al., 2019; Hernando-Amado S. et al., 2020).

Несмотря на многочисленные исследования, направленные на разработку антибактериальных препаратов, число новых эффективных антибиотиков, прошедших всесторонние испытания и рекомендованных к клиническому использованию, с каждым десятилетием снижается, приближая «постантибиотическую эру» (Morel C.M. et al., 2020; Yu Z. et al., 2020). Анализ разработок в этой области указывает на то, что исследователи нацелены на получение новых эффективных антибиотиков, но направленных на консервативные мишени: клеточную стенку и белковый синтез микроорганизмов (Theuretzbacher U. et al., 2020). Внедрение в клиническую практику таких препаратов неизбежно повлечёт за собой угнетение нормальной микрофлоры и ещё большее распространение антибиотикоустойчивости.

В сложившейся ситуации оправданным представляется поиск противомикробных средств с механизмами действия, направленными на наиболее консервативные структуры микробной клетки, изменчивость которых, в рамках развития резистентности, является критической для протекания нормальных физиологических процессов (Wang C.-H. et al., 2020). В этом смысле перспективной группой соединений являются пептидные антибиотики или антимикробные пептиды (АМП).

Поиск новых источников АМП является актуальным как с точки зрения фундаментальных знаний о структурно новых антимикробных молекулах, так и с позиции прикладной биотехнологии в рамках разработки простых и экономически целесообразных способов получения препаратов, обогащен-

ных АМП. Выделение и структурно-функциональное изучение пептидных антибиотиков создают предпосылки для производства химически или биотехнологически синтезированных гомологов этих соединений (Кокряков В.Н., 2006).

Приведённая выше краткая характеристика современного уровня работ по тематике диссертации однозначно свидетельствует об актуальности и практической востребованности работы Е.К. Ремезова, посвященной выделению пептидов из биомассы личинок *Galleria mellonella*, *Musca domestica*, изучению их антимикробной активности и биотрансформации в организме белых мышей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Автором изучены и критически проанализированы публикации и теоретические положения других исследователей, касающиеся вопросов функциональной активности антимикробных пептидов (Kokryakov V.N., 1999; Silva P.I. et al., 2000; Ashby M. et al., 2014; Tonk M., Vilcinskas A., 2017; Machado V. et al., 2020). Высказанные ранее соображения и гипотезы, убедительно свидетельствующие о значительном потенциале пептидных антибиотиков насекомых, как неисчерпаемом источнике антимикробных препаратов нового поколения, стали отправной точкой исследования.

С помощью оригинальной схемы, включающей в себя холодную экстракцию и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), автором из биомассы личинок большой восковой моли (*G. mellonella*) и комнатной мухи (*M. domestica*) выделены водорастворимые соединения, обладающие антимикробной активностью.

Методами серийных разведений, диффузии в агар и микротитрования в бульоне оценена антимикробная активность индивидуальных соединений, полученных в результате хроматографических процедур в отношении тест-культур: *S. aureus* 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *C. albicans* РКПГУ-401/NCTC-885-653, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027. Определены минимальные концентрации тестируемых соединений, обладающие антимикробной активностью.

Использование АМП, меченых ФИТЦ, позволило оценить особенности распределения пептидных антибиотиков в органах при парентеральном введении в организм белых мышей.

Таким образом, достаточный объём исследованной выборки, информативность методических подходов, сопоставление результатов с данными на-

учной литературы дают основания считать полученные результаты и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованными.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов.

Достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, определяется достаточным объёмом проведённых исследований, а также использованием современных биохимических, микробиологических и биологических методов анализа.

Оценивая новизну исследований, представляется необходимым отметить следующие моменты:

- разработана схема выделения водорастворимых АМП из биомассы личинок большой восковой моли и комнатной мухи, включающая этап пробоподготовки и ВЭЖХ;

- охарактеризован спектр антимикробной активности полученных фракций, включающий как грамотрицательные, грамположительные бактерии, так и грибы рода *Candida*.

Несомненный интерес представляют результаты изучения особенностей распределения АМП в организме белых мышей.

Новизна исследований подтверждается патентом на изобретение РФ.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных об антимикробных соединениях из личинок огнёвки пчелиной и комнатной мухи. Предложена схема выделения АМП из личинок насекомых; с использованием оригинального метода выделения получены очищенные антимикробные фракции из биомассы *G. mellonella* и *M. domestica*; охарактеризованы спектр их антимикробной активности и особенности распределения по органам и тканям белых мышей.

Диссертационная работа Е.К. Ремизова имеет также научно-практическое значение. Полученные результаты по выделению и анализу биологических свойств антимикробных пептидов из личинок большой восковой моли и комнатной мухи создают предпосылки для разработки нового перспективного класса антимикробных препаратов, эффективных в отношении резистентных форм патогенных микроорганизмов.

Разработанная автором система выделения водорастворимых АМП из биомассы личинок насекомых может быть использована для получения новых средств, обладающих антимикробной активностью.

Содержание диссертации, её завершенность.

Диссертация Е.К. Ремизова является завершенной научно-квалификационной работой, написанной в традиционном стиле. Работа достаточна по объёму (101 страница печатного текста), построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Она иллюстрирована 32 рисунками и 21 таблицей.

Содержание диссертации позволяет получить представление о целях и задачах исследования. Введение и обзор литературы ориентируют читателя в основных проблемных вопросах поднятой темы. В литературном обзоре представлены данные об антимикробных пептидах, механизме их действия, перспективах использования; дана сравнительная оценка антимикробной активности традиционных и пептидных антибиотиков; описаны особенности содержания и выращивания *G. mellonella* и *M. domestica*. В первых двух подразделах главы «Собственные исследования» представлено описание объектов исследования, материалов и методов, применяемых при выполнении диссертационной работы.

Шесть подразделов раздела «Результаты исследований и их обсуждение» посвящены изложению результатов экспериментов, проведённых диссертантом, по выделению и характеристике биологических свойств антимикробных соединений, полученных из личинок огнёвки пчелиной и комнатной мухи. Описано выделение гомогенных препаратов из личинок, изучение антимикробной активности пептидных антибиотиков в отношении тест культур микроорганизмов и особенности распределения по органам и тканям белых мышей. Объём выполненных исследований достаточен для решения поставленных задач. Каждый раздел собственных исследований завершается кратким резюме.

Заключение объективно отражает полученные результаты с их адекватной интерпретацией. Выводы работы соответствуют задачам исследования. Список литературы включает в себя 165 источников, в том числе 135 работ иностранных авторов.

Работа хорошо апробирована. Её результаты были представлены на семи конференциях, форумах и конкурсах. Основные положения диссертации отражены в семи научных работах, одна из которых в журнале, входящем в перечень ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, получен 1 патент РФ на изобретение.

Диссертация носит завершённый характер. Автореферат отражает основные материалы диссертации.

Вместе с тем, хотелось бы сделать ряд замечаний, требующих пояснений и, касающихся в большей степени формы, нежели содержания работы и существенно не уменьшающих ценности диссертационного исследования:

1. Имеются неудачные обороты (стр. 10, 11, 12, 18, 21, 22, 71 – например, «линейные пептиды, которые принимают настройку», «примеры включают цекропин», «среди их числа устройство», «АМП варьируются в различиях в мембранном потенциале», «эскалация инфекционных заболеваний, устойчивых к обычным антибиотикам», «длительное воздействие низких уровней антимикробного соединения»), опечатки (стр. 6, 21, 23, 54, 65), неправильные выражения (стр. 4, 5, 10, 22, 75 – например, «терапия заболеваний»), пунктуационные ошибки (стр. 4, 9, 14, 32, 35, 36, 52, 57, 68), жаргонизмы (стр. 32 – «раствор вкалывали в хроматограф»), ошибки в нумерации разделов диссертационной работы (стр. 25).

В тексте диссертации и автореферата допущено множество досадных ошибок и неточностей, касающихся применяемых методов. Например, производителем хроматографической колонки «BioSep SEC-S-2000» является компания Phenomenex (США), а не BioSep (стр. 36). Характеристики SEC-колонки тоже указаны неверно (стр. 36 диссертации, стр. 6 и 10 автореферата). В описании режима ВЭЖХ-разделения содержатся непонятные указания, например, «80 мм» (стр. 8, второе положение, выносимое на защиту).

2. Во втором подразделе литературного обзора приводятся сведения о существующих инсектариях для выращивания насекомых, однако задачи диссертационного исследования не подразумевают разработку или усовершенствование существующих методов разведения этого класса беспозвоночных. Поскольку работа посвящена выделению и характеристике биологических свойств АМП насекомых, в обзоре литературы следовало бы сделать акцент на существующих способах получения гомогенных пептидных фракций, особенностях антимикробного действия, биотрансформации указанных молекул.

3. В разделе «Материалы и методы» отсутствуют ссылки на некоторые ключевые методы исследования. Например, непонятно как проводилась статистическая обработка полученных результатов?

4. Рисунки 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 и таблицы 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 содержат повторяющиеся данные (время удерживания, площадь пика).

5. Информативность рисунков 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 низкая.

6. Библиографический список оформлен с ошибками; дублируются отдельные источники литературы (например, 41).

Кроме того, при изучении диссертационной работы Е.К. Ремизова появилось несколько вопросов:

1. На каком основании Вы утверждаете, что полученные в результате хроматографического разделения и охарактеризованные вещества имеют белковую или пептидную природу? Так, диапазон молекулярных масс порядка нескольких кДа ещё не является для этого достаточным основанием. Были ли Вами проведены какие-либо дополнительные структурные исследования, подтверждающие данный тезис? Детектирование в образцах наличия белковых соединений методом Лоури является лишь косвенным доказательством того, что именно белки/пептиды определяют антимикробные свойства полученных экстрактов.

2. Чем Ваша оригинальная методика выделения и очистки антимикробных соединений из личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica* принципиально отличается от других схем выделения АМП (из насекомых)? Актуальна ли разработанная методика при масштабировании процессов выделения АМП в условиях биотехнологического производства?

3. Уточните, пожалуйста, чем продиктована необходимость тестирования антимикробной активности полученных соединений тремя разными методами: серийных разведений в пробирках, диффузионным методом и методом микротитрования в бульоне? Надёжным и воспроизводимым методом, рекомендуемым для оценки антимикробной активности катионных АМП, является модифицированный метод микротитрования в бульоне, предложенный лабораторией R.E.W. Hancock (1999).

4. С какой целью при оценке антимикробной активности АМП делали «контрольные высевы из лунок с низкой (0,625 мг/л) и высокой (10 мг/л) концентрацией пептида» (стр. 60), если минимальная бактерицидная концентрация антибиотика определяется путем посева содержимого из первых 3-х лунок, демонстрирующих отсутствие видимого роста бактерий?

5. Согласно данным таблицы № 20 (стр. 56) с уменьшением концентрации тестируемых антимикробных соединений увеличивались зоны задержки роста чувствительных тест-культур. Как Вы можете объяснить этот факт?

6. На странице 69 диссертации автор приходит к заключению, что «АМП ... могут захватываться иммунокомпетентными клетками при попадании в кровеносное русло, а затем транспортируются в органы иммунной системы, где и метаболизируются». Хотелось бы уточнить, на результатах каких исследований базируется это утверждение?

Заданные вопросы носят дискуссионный характер и не умаляют значе-
ние результатов, полученных автором.

Заключение.

Диссертационная работа Ремизова Евгения Кирилловича на тему:
«Разработка способа получения пептидов, выделенных из личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica* и изучение их биологических свойств», пред-
ставленная к защите на соискание учёной степени кандидата сельскохозяйст-
венных наук, является научно-квалификационной работой, в которой на ос-
новании выполненных исследований решена научная задача получения и
изучения биологических свойств антимикробных пептидов насекомых, что
имеет существенное значение для биотехнологии и соответствует требовани-
ям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденно-
го постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября
2013 г. № 842, а автор заслуживает присуждения искомой учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.01.06 Биотехно-
логия (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:

Сычева Мария Викторовна, доктор биологиче-
ских наук, профессор, заведующий кафедрой
микробиологии и заразных болезней федераль-
ного государственного бюджетного образова-
тельного учреждения высшего образования
«Оренбургский государственный аграрный уни-
верситет»



460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение выс-
шего образования «Оренбургский государственный аграрный университет»

Тел.: 8(3532)77 52 30

Эл.почта: ogau@mail.esoo.ru

Подлинность подписи заведующего кафедрой микробиологии и заразных бо-
лезней, д.б.н., профессора М.В. Сычевой подтверждаю:

Ректор ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

А.Г. Гончаров

«27» ноября 2014 г.

