

УТВЕРЖДАЮ

Ректор

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина)



С.В. Полябин

« 14 » февраля 2024 г.

### Отзыв

**ведущей организации** – федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина) на диссертационную работу Ремизова Евгения Кирилловича «Антимикробная активность пептидов, выделенных из насекомых, и перспектива их использования в качестве противомикробных препаратов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных» в диссертационный совет 35.2.035.01 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

#### Актуальность выполненной работы

Диссертационная работа Ремизова Евгения Кирилловича обусловлена необходимостью поиска новых антибактериальных факторов эффективных для лечения инфекционных заболеваний, в том числе вызываемых антибиотикорезистентными штаммами. Антибиотикорезистентность циркулирующих бактериальных патогенов приобретает глобальный характер и несет серьезную угрозу социуму.

Наиболее экономически значимыми среди возбудителей зоонозов являются *Salmonella spp.* и *Escherichia coli spp.*, отмечается возрастающее влияние таких микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus spp.* и *Bacillus cereus spp.* в инфицировании продуктов питания и заболевании сельскохозяйственных животных. Лечение животных с использованием антибиотиков при нарушении технологий, приводит к селекции антибиотикорезистентных штаммов, что в свою очередь затрудняет лечение заболеваний, вызываемых такими возбудителями. Этим была обусловлена необходимость разработки новых, безопасных, эффективных и натуральных противомикробных средств. Среди них – антимикробные пептиды насекомых, обладающие барьерной функцией и способные защищать макроорганизм от различных патогенных агентов. В процессе эволюции насекомые сформировали огромный потенциал с большим арсеналом

пептидов, как результат – они являются наиболее перспективным источником для поиска новых агентов, т.к. обладают потенциально низкой возможностью селекции антибиотикорезистентных штаммов. Как известно, антимикробные пептиды (АМП) насекомых выполняют барьерную функцию, защищая организм от заражения патогенными микроорганизмами. По имеющейся информации личинки *Calliphora vicina* синтезируют и накапливают в гемолимфе комплекс антимикробных пептидов, в состав которого входят дефензины, цекропины, диптерицины и пролинбогатые пептиды. Одни из этих пептидов избирательно повреждают клеточную стенку грамположительных (дефензины) или грамотрицательных (диптерицины, цекропины) бактерий, другие нарушают синтез белков и РНК в бактериальной клетке (пролинбогатые пептиды).

В этой связи выделение антимикробных пептидов и изучение их антибактериальной активности позволит выявить потенциальную возможность их использования в качестве противомикробных препаратов, актуальны сравнение действия антимикробных пептидов разных видов, принадлежащих к разным таксонам, а также изучение специфичности их действия в отношении спектра микроорганизмов.

Научно-исследовательская работа Ремизова Евгения Кирилловича по выделению наиболее перспективных антимикробных пептидов актуальна для современной ветеринарии и позволит решить проблемы нарушения микробиоценозов живых организмов, будет способствовать терапии заболеваний, в том числе антибиотикорезистентными штаммами.

Все изложенное обосновывает актуальность темы рассматриваемой диссертации, посвященной разработке методов выделения пептидов из биомассы личинок *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* и изучению их антимикробной активности по отношению к референтным штаммам микроорганизмов.

#### **Научная новизна работы**

Автором установлено, что для получения фармацевтической композиции на основе антимикробных пептидов необходимо соблюдение трех основных стадий: высаливания, хроматографического разделения и создания конечной фармацевтической композиции.

Разработана оригинальная методика получения водорастворимых пептидов из биомассы личинок и доказана антимикробная активность пептидов, выделенных из *G. mellonella*, *M. domestica*, *H. illucens* по отношению к штаммам *S. aureus* 6538 (209-P), *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027.

Выявлены пептиды 3 и 6, выделенные из *G. mellonella*, обладающие наиболее высокой антимикробной активностью.

Установлено, что антимикробные пептиды, меченые флюоресцеин изотиоцианатом, спустя сутки после введения локализуются, главным образом, в печени и селезенке. Изучены показатели острой токсичности АМП на лабораторных мышах.

На основании проведенных экспериментальных исследований диссертационной работы получен патент на изобретение: Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *M. domestica*, и способ ее получения (№ 2018142602 от 04.12.2018).

### **Практическая значимость работы**

Исходя из современных представлений о том, что в процессе эволюции насекомые сформировали мощный антимикробный потенциал с большим разнообразием антимикробных пептидов, теоретически обоснована перспективность насекомых как источника поиска новых противомикробных агентов.

Разработан алгоритм выделения из биомассы насекомых экспериментальных образцов антимикробных пептидов. Установлено, антимикробное действие полученных антимикробных композиций на различные виды микроорганизмов, в том числе мультирезистентные штаммы *S. typhimurium* 1626, *B. cereus* ATCC 10702, *E. coli* 1027, что дополняет имеющиеся сведения о биологических свойствах возбудителей инфекций, вызываемых этими штаммами. Полученные диссертантом данные по распределению АМП в организме лабораторных мышей при различных способах введения имеют определенную теоретическую значимость для дальнейших исследований.

Практическая значимость работы вытекает из актуальности темы, научной новизны, поставленных и решенных задач. Полученный патент определяет результат интеллектуальной деятельности как основу перспективной разработки выводов.

Результаты исследований используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий с обучающимися факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий ФГБОУ ВО Вавиловский университет.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов подтверждена достаточным объемом экспериментальных данных с подтверждением их методами математической статистики. Концепция работы выстроена в соответствии с требованиями научной методологии. Применены адекватные методы исследований для получения объективных, контролируемых и воспроизводимых результатов.

Основные результаты диссертационной работы успешно апробированы, опубликованы и представлены в материалах на:

Международном конкурсе инноваций «Молодой Учёный Alltech (2018)»;

Международной конференции BI's 9th anniversary World DNA Day – 2018 (Китай, Далянь, 2018);

Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на II этапе (Киров, 2018);

Национальной научно-практической конференции в ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им Н. И. Вавилова (Саратов, 2018);

Конкурсе научно-инновационных работ молодых ученых и студентов ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им Н. И. Вавилова, Грант Ректора (Саратов, 2018);

Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Минсельхоза России на III этапе (Оренбург, 2018);

XXIII Агропромышленном форуме юга России и выставке «Интерагромаш» «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса»,

посвященной 90-летию ФГБОУ ВО Донской государственный технический университет (Ростов-на-Дону, 2020).

#### **Сведения о полноте публикаций**

По материалам диссертации опубликованы 9 научных работ, в том числе 3 статьи в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденного ВАК Министерства образования и науки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени и 1 патент.

#### **Оценка языка и стиля диссертации и автореферата**

Материалы диссертации и автореферата изложены в доступной форме, научным языком, в удовлетворительной лексической и грамматической доступности. Содержание автореферата соответствует материалам диссертационной работы и отражает основные её результаты.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Описание объекта и методов исследования», «Результаты исследований и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список использованных литературных источников». Работа изложена на 115 страницах, содержит 26 рисунков и 19 таблиц. Список литературы включает 201 наименования, в том числе 177 иностранных научных работ.

Задачи для решения поставленной автором цели полностью выполнены. По полученным результатам исследований Ремизов Е.К. логично, научно-обоснованно, с учетом данных российской и зарубежной литературы сформулировал 5 выводов. Структура и содержание диссертации соответствуют ГОСТ 7.0.11-2011.

#### **Личный вклад автора**

Все основные разделы диссертационной работы, касающиеся актуальности, научной новизны, теоретической и практической значимости, раскрывающие объект, структуру исследований, получение, анализ и обобщение результатов, оформление выводов, выполнены лично автором.

Содержание диссертации и количество публикаций по теме исследования указывает на достаточный личный вклад автора в представленной диссертационной работе.

При ознакомлении с работой у ведущего учреждения возникли нижеследующие **вопросы и замечания**:

1. Уточните, пожалуйста, экспериментальные данные по подбору оптимальных условий выделения и очистки водорастворимых пептидов из биомассы насекомых, что является задачей ваших исследований (патент № 2018142602 от 04.12.2018) (см. стр. 41-42).

2. Охарактеризуйте материальные затраты получения препаративного количества пептидов разработанным методом. Какова удельная активность (удельное содержание) антимикробных пептидов (АМП) при различных этапах их

выделения и в конечных продуктах, что имеет значение для оценки экономической эффективности способа?

3. Поясните, пожалуйста, с какой целью использовались макро- микро- и диффузные методы для оценки антибактериальной активности разных фракций полученных АМП, сравните их результаты. Охарактеризуйте МИК и МБК исследуемых АМП.

4. Поясните, чем определяется выбор именно фракции пептида 1.2, выделенного из биомассы личинок *G.mellonella* для тестирования диффузным методом.

5. Сопоставьте антимикробную активность антибиотиков, обычно применяемых в случаях грамположительных и грамотрицательных патогенов (таблица 9) с активностью АМП, полученных Вами.

6. В разделе «Научная новизна» диссертации написано: «Установлено, что для получения фармацевтической композиции на основе антимикробных пептидов необходимо соблюдение трех основных стадий: высаливания, хроматографического разделения и создания конечной фармацевтической композиции». Уточните, пожалуйста, о какой именно «фармацевтической композиции» идет речь?

7. В тексте диссертации имеются опечатки и встречаются неудачные выражения. Например, на стр. 13 диссертации написано «Антимикробные пептиды играют важную роль в защите насекомого от неблагоприятных факторов среды (Обнаружение и выделение антибактериальных пептидов..., 2006; Выделение антибактериальных компонентов..., 2007). Антимикробные пептиды выделяют из личинок (24%), из яда (22%), взрослых особей (19%), синтезированных пептидов (18%), куколок (11%), генетически модифицированных объектов (4%) и из питательной среды (2%)». Уточните, пожалуйста, из какого «яда» и из каких «питательных сред» выделяют эти пептиды?

Приведенные вопросы к диссертанту и замечания не снижают ценности рассматриваемой работы, ее вклада в решение актуальной задачи научного и практического значения.

### **Заключение**

Диссертационная работа Ремизова Евгения Кирилловича является законченной, комплексной научно-исследовательской работой, а личный вклад автора заключается в формулировании основных положений диссертации, постановке целей и задач исследований, планировании и реализации эксперимента, обобщении результатов, разработке перспектив их применения и использовании их в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий.

На основании изложенного, учитывая актуальность темы, новизну и практическую ценность диссертационной работы Ремизова Евгения Кирилловича «Антимикробная активность пептидов, выделенных из насекомых, и перспектива их использования в качестве противомикробных препаратов», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных» считаем, что представленная диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного

Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Ремизов Е.К., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных».

Отзыв обсужден и одобрен на расширенном заседании сотрудников и аспирантов кафедры иммунологии и биотехнологии ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина: протокол №10 от 13 февраля 2024 года.

Заведующий кафедрой иммунологии и биотехнологии  
федерального государственного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Московская государственная академия ветеринарной  
медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»  
(ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина),

доктор биологических наук по специальностям 06.02.02 «ветеринарная  
микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и  
иммунология» и 03.01.06 «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»,

профессор,  
профессор РАН,

Почетный работник АПК России

Пименов Николай Васильевич

Профессор кафедры иммунологии и биотехнологии  
ФГБОУ ВО МГАВМиБ-МВА имени К.И. Скрябина,

доктор ветеринарных наук по специальности 16.00.03 «ветеринарная  
микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология»,  
профессор,

действительный государственный  
советник третьего класса,

Почетный работник АПК РФ

Литвинов Олег Борисович

Профессор кафедры иммунологии и биотехнологии  
ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина»,

доктор биологических наук, по специальностям 03.00.23 «биотехнология» и  
16.00.04 «ветеринарная фармакология и токсикология»,  
профессор

Мирзаев Микаиль Нурбагандович

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования  
«Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии  
– МВА имени К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, ул. Ак. Скрябина, д.23  
84953779117, rector@mgavm.ru

Подписи профессоров Н.В. Пименова, О.Б. Литвинова, М.Н. Мирзаева  
заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина»,  
кандидат сельскохозяйственных наук,  
доцент



Маркин Сергей Сергеевич

14.02.2024 г.