

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
Гаврюшиной Ирины Александровны
на тему: “Биологическая активность новых антимикробных пептидов–
эмерициллипсинов и разработка биотехнологии их получения”
по специальности 1.5.6. Биотехнология**

Актуальность темы исследования.

Эра антибиотиков началась уже почти 100 лет тому назад, с момента открытия Флемингом пенициллина, а Ваксманом стрептомицина. Внедрение в медицинскую практику таких мощных лекарственных средств было настоящей революцией. Однако, по мере их применения, ответной реакцией патогенных микроорганизмов была выработка лекарственной устойчивости к антибиотикам – антибиотикорезистентности. В настоящее время в медицине все острее встает проблема неэффективности антибиотиков, поэтому *актуальной задачей* является изыскание новых соединений, преодолевающих множественную (multi-drug) или абсолютную (extreme-drug resistant) устойчивость патогенных микроорганизмов, которые могли бы пополнить существенно уменьшившийся арсенал лекарственных средств. К соединениям такого рода относится антимикробный пептид эмерициллипсин А (EmiA) - пептид, впервые полученный российскими исследователями Тюменского государственного университета, работающими совместно с коллегами из научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе в 2018 г. На сегодняшний день известна уникальная способность эмерициллипсина А подавлять у патогенных бактерий способность к образованию биопленок, благодаря чему снижается устойчивость к антибиотикам. Подобные исследования широко проводятся за рубежом в рамках разных проектов и регулярно публикуются в Nature и других журналах.

Однако масштабного скрининга способности к образованию и накоплению противогрибковых соединений, в частности эмерициллипсинов

в разных биотехнологических системах на большой выборке культур у грибов рода *Emericellopsis* ранее не проводилось.

В этой связи, несомненно актуальной и первоочередной задачей, нашедшей свое решение в работе Гаврюшиной Ирины Александровны, представляется исследование биологической активности новых антимикробных пептидов – эмерициллипсинов, выделенных из алкалофильных грибов, и разработка технологии их получения.

Структура диссертации. Диссертационная работа И.А.Гаврюшиной изложена на 182 страницах машинописного текста. Диссертация построена по традиционному плану и включает “Введение” “Обзор литературы”, “Объекты и методы исследования”, “Результаты и их обсуждение”, а также разделы “Заключение”, “Выводы”, “Список сокращений”, «Приложение» и “Список литературы”, содержащий 240 источников, в том числе 227–на иностранном языке. Работа содержит 23 рисунка и 11 таблиц.

Основные положения диссертации в достаточной мере изложены в 7 печатных работах, в том числе 5 научных публикаций в журналах, индексируемых базами данных из списка Web of Science, SCOPUS и RSCI, из них 2 статьи в журналах 1 квартиля. Имеется патент РФ. Опубликованные автором статьи отражают основное содержание диссертационной работы.

Общая характеристика и оценка содержания работы.

Во “**Введении**” автором обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, его научная и практическая новизна и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает 7 разделов, в которых дано представление о состоянии обсуждаемых вопросов на современном уровне. Обзор содержит анализ имеющейся отечественной и зарубежной литературы.

В главе “Объекты и методы исследований”

При выполнении работы использовался широкий набор методов исследования, включая микробиологические и физиологические. Не вызывают сомнений высокий уровень и тщательность их исполнения,

свидетельствующие о необходимой для этого квалификации диссертанта. Все результаты экспериментальной работы подтверждены статистически.

Полученные И.А. Гаврюшиной результаты обладают **научной новизной**. Впервые охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида – эмерициллипсины (EmiB-E), синтезирующиеся изолятами алкалофильных грибов *Emericellopsis alkalina*. Установлена структура их полипептидных последовательностей, изучена их противогрибковая активность, которая зависит от первичной структуры полипептидной цепи. Установлены минимальные ингибирующие концентрации для каждого из выделенных эмерициллипсинов. Разработан эффективный способ выделения антибиотиков из культуральной жидкости продуцента и показано его наличие в мицелии. Разработана технологическая схема для наработки основного компонента EmiA для отобранного штамма-продуцента.

Помимо выраженного противогрибкового действия, эмерициллипсин А обладал слабым ингибирующим действием на формирование биопленок грамположительных бактерий – клинически значимых возбудителей инфекционных заболеваний. Антибиопленочная активность пептида находилась в диапазоне от 50 до 200 мкг/мл для грамположительных бактерий (*S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*).

Диссертационная работа Гаврюшиной И.А. имеет **практическую значимость**. Практическое применение антимикробных пептидов (АМП) как потенциальных лекарственных средств в клинике ограничено их токсическим действием на клетки человека. Поэтому актуальна оценка гемолитических и цитотоксических эффектов при отборе соединения – кандидата для разработки новых антибиотиков. Установлено, что EmiA обладает низкой и избирательной цитотоксической активностью. При исследовании эффекта на эритроциты человека показано низкое гемолитическое действие пептида, что свидетельствует о перспективности данного соединения для дальнейшего изучения. Полученные экспериментальные результаты позволяют рекомендовать EmiA как

потенциально эффективное соединение - антимикотик, проявившее одновременно высокую противогрибковую активность и низкую цитотоксичность. Полученные данные могут быть использованы в области создания и разработки новых антибиотиков с противогрибковым действием для лечения глубоких и инвазивных микозов.

В разделе "**Заключение**" проводится анализ полученных результатов, их сравнение с имеющимися в литературе сведениями и даётся оценка их фундаментального и прикладного значения.

Выводы, сделанные в работе, соответствуют цели и задачам исследования. Они обоснованы и достоверны. Положения, выносимые на защиту, подтверждены результатами диссертационного исследования.

В работе рассматривается одна из важнейших проблем современного здравоохранения, решение которой – преодоление антибиотикорезистентности, является непростой задачей современной науки. Необходимо понимать, что устойчивость к одному антибиотику может обуславливаться разными или одновременно несколькими механизмами. Некоторые клинические штаммы бактерий, например, устойчивые к бета-лактамам антибиотикам, содержат гены, кодирующие белки инактивации антибиотика и пенициллинсвязывающие белки с измененной структурой.

Доминирующий компонент – пептид EmiA обладает противогрибковым действием в отношении клинических изолятов патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью. В связи с этим, хотелось бы уточнить, что лежит в основе механизма, обеспечивающего такой результат. Учитывая, что современный арсенал методов подразумевает использование молекулярно-биологических подходов, хотелось бы пожелать автору выйти на молекулярные механизмы анализа функциональных генов, отвечающих за определенные резистентные свойства.

Автором диссертации были использованы методы культивирования в различных биотехнологических системах (глубинное, мембранно-

жидкостное, поверхностное культивирование). Влияет ли способ культивирования на образование гомологов эмерициллипсина?

Поверхностное и глубинное культивирование проводили при различных значениях рН. Измеряли ли рН среды в процессе эксперимента и сохранялись ли эти значения со временем?

Известно, что антимикробные пептиды воздействуют на клеточную стенку грибов, ингибируя синтез глюкана или хитина. Насколько перспективно использование АМП совместно, например с ферментами хитиназами.

Заданные вопросы не влияют на общую положительную оценку работы И.А.Гаврюшиной. Диссертация написана соискателем самостоятельно, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения. Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертации.

Заключение. Диссертационная работа И.А.Гаврюшиной “Биологическая активность новых антимикробных пептидов—эмерициллипсинов и разработка биотехнологии их получения” является научно-квалификационной работой и представляет собой завершенное научное исследование, посвященное решению научной задачи, актуальной для биотехнологии. Диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и методическом уровне, содержит новый статистически обработанный и достоверный экспериментальный материал. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости диссертация И.А.Гаврюшиной отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова. Содержание работы соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также

оформлена, согласно приложениям № 5,6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Гаврюшина Ирина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры биологии почв
факультета почвоведения Федерального государственного образовательного
учреждения высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
доктор биологических наук, профессор

Манучарова Наталия Александровна

Контактные данные:

тел.: 8(495)9393405, e-mail: manucharova@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.02.03 – микробиология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д. 1 стр. 12,
МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения
Тел.: +7(495)9392947; e-mail: main@soil.msu.ru

Подпись профессора кафедры биологии почв
факультета почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова
Н.А.Манучаровой заверяю

И.о. декана факультета почвоведения
МГУ имени М.В.Ломоносова
чл.-корр. РАН _____

П.В.Красильников

«06» февраля 2023г.