

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шестака Никиты Викторовича
на тему: «Изучение каталитической и бактериолитической активности
рекомбинантного белка лизостафина из *Staphylococcus simulans*»
по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

Лизостафин из *Staphylococcus simulans* является двухдоменной цинк-зависимой эндопептидазой, разрушающей пентаглициновый мостик в структуре пептидогликана *Staphylococcus aureus*. С точки зрения борьбы с антибиотикоустойчивыми штаммами патогенных микроорганизмов он является одним из перспективных антибактериальных лизинов, способных бороться с антибиотикоустойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, одного из основных возбудителей госпитальных инфекций. В связи с этим исследование каталитической и бактериолитической активности лизостафина и их взаимосвязи друг с другом является актуальным для биоинженерии противомикробных фармпрепаратов. Исходя из вышесказанного, актуальность темы диссертации Н.В. Шестака не вызывает сомнений.

Диссертационная работа выстроена традиционно и включает в себя список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, основные результаты и выводы, а также список литературы. Работа содержит 139 страниц машинописного текста, 48 рисунков, 6 таблиц и ссылается на 200 литературных источников.

В разделе «Введение» автор подробно обосновывает актуальность и значимость проведенных исследований: кратко описывает проблему возникновения антибиотикорезистентных штаммов патогенных бактерий, в частности штаммов метициллин-устойчивого *S. aureus*, и, как следствие, необходимость в разработке новых эффективных антибактериальных агентов, способных бороться с ними. Далее следует описание

антибактериального лизина лизостафина, который эффективен в отношении антибиотикоустойчивых штаммов *S. aureus*, с основным вниманием на методы исследования активности лизостафина и определение вклада различных доменов белка в наблюдаемый уровень его активности, а также способы получения чистого рекомбинантного лизостафина и их влияние на активность получаемого очищенного фермента.

Раздел «Литературный обзор» состоит из нескольких глав. В первой главе Н.В. Шестак емко описывает ретроспективу антибиотикорезистентности золотистого стафилококка и подчеркивает важность и актуальность решения данной проблемы. В следующей главе подробно описывается структура пептидогликана грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток, в частности грамположительного *S. aureus*. Затем следует глава, посвященная антибактериальным лизинам в целом, их структуре и видам. Заканчивается данный раздел подробным описанием антибактериального лизина лизостафина. Особое внимание в данной главе уделяется методам исследования активности лизостафина, влиянию каталитического иона металла на активность не только лизостафина, но и других представителей эндопептидаз семейства M23, к которому он относится, а также способам выделения и очистки рекомбинантного лизостафина для получения чистых препаратов фермента.

Раздел «Материалы и методы» содержит описание использованных материалов, оборудования и методов. В данном разделе представлен широкий набор биохимических и биоинженерных методов, использованных Н.В. Шестаком для получения различных вариантов рекомбинантного лизостафина и исследования их активности с применением различных субстратов. Следует отметить, что раздел написан основательно и подробно. Очевидно, что автор на высоком уровне владеет использованными при выполнении диссертационной работы методами

В разделе «Результаты и их обсуждение» в первой главе Н.В. Шестак описывает разработанный им метод исследования каталитической активности лизостафина с использованием изолированного пентаглицина. Этот метод используется автором в дальнейших исследованиях для определения каталитической эффективности различных вариантов лизостафина. Следующая глава диссертационной работы посвящена исследованию каталитической (с использованием пентаглицина и разработанного автором ранее метода), пептидогликанолитической (с использованием очищенных пептидогликановых оболочек золотистого стафилококка) и бактериолитической (с использованием интактных клеток золотистого стафилококка) активностей вариантов лизостафина с ионами различных металлов, встроенных в его активный центр. Активность полученных вариантов лизостафина с ионами различных металлов варьирует от практически нулевых значений для ионов кальция и магния до уровня нативного цинксодержащего белка для ионов кобальта. Полученные линейные зависимости пептидогликанолитической и бактериолитической активностей лизостафина от его каталитической эффективности указывают на возможность улучшения антибактериальной активности лизостафина за счет повышения его каталитической эффективности. Кроме того, представленные в этой главе данные позволили автору сделать предположение о том, что очистка рекомбинантного лизостафина при помощи никель-хелатных аффинных хроматографических сорбентов может негативно влиять на активность фермента. В последней главе раздела «Результаты и их обсуждение» при изучении каталитической и бактериолитической активности препаратов рекомбинантного лизостафина, полученных с использованием различных хроматографических сорбентов было подтверждено, что при очистке лизостафина с использованием никель-хелатных хроматографических сорбентов с относительно слабым связыванием ионов металла с частицами сорбента каталитическая и бактериолитическая активности фермента снижаются. Для нивелирования

этого эффекта автором предложено использование никель-хелатных хроматографических сорбентов с относительно высокой силой связывания ионов никеля (например, сорбент WorkBeads NiMAC) или цинк-хелатных хроматографических сорбентов. Кроме того, предложена методика восстановления активности рекомбинантного лизоафрина путем удаления всех ионов металлов из активного центра лизоафрина и последующего встраивания в него иона цинка. Данную методику, по мнению автора, можно адаптировать для других металлсодержащих ферментов. Разработанные подходы к хроматографической очистке лизоафрина и восстановлению его активности могут быть использованы в целях стандартизации и производства высокоактивных препаратов лизоафрина, а также для разработки новых поколений лекарственных средств против инфекционных заболеваний, вызванных *S. aureus*.

Работа Н.В. Шестака – достаточно объемное, цельное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне с применением современных методов исследования, что обуславливает надежность полученных экспериментальных данных.

Диссертация лишена существенных недостатков, которые могли бы препятствовать ее успешной защите. Тем не менее, в отношении работы можно сделать несколько замечаний.

1. Описывая получение препарата лизоафрина (разделы 4.1.1 и 4.3.2), было бы целесообразно не только привести результаты электрофоретического анализа, но и представить ход очистки в таблице, где были бы указаны выход фермента и степень очистки на каждой стадии.

2. Численные значения и их погрешности в работе (на страницах 64, 65, 66, 94, 102 и 113, а также в таблицах 1, 2, 3, 5 и 6) округлены некорректно и приведены с незначущими цифрами.

3. В работе присутствует дублирование данных на рисунках, в таблицах и тексте, например, в таблице 2 и на рисунке 4.15; в таблице 3 и на рисунке 4.29; в таблице 5 и на рисунках 4.35, 4.36; в таблице 6 и на рисунках 4.37, 4.38. Такого дублирования, несомненно, следует избегать, так как оно затрудняет восприятие материала читателем.

4. В тексте повсеместно используется некорректный термин «численная оценка» в отношении каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностей. Во всех таких случаях необходимо использовать термин «количественная оценка».

Следует подчеркнуть, что высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности диссертационной работы, которая, безусловно, заслуживает высокой оценки.

По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в международных рецензируемых научных журналах (в том числе 3 из них на момент публикации в журналах Q1), результаты работы неоднократно докладывались на профильных международных научных конференциях. Достоверность, новизна и научная значимость предложенных автором методик и полученных результатов не вызывают сомнений, а выносимые на защиту положения и сделанные выводы обоснованы. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Никита Викторович Шестак заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, доцент по специальности биотехнология (в том числе бионанотехнология), профессор РАН, начальник лаборатории функциональной энзимологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»)

Демидюк Илья Валерьевич



(подпись)

«30» сентября 2024 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (903) 612-06-05, e-mail: ilyaduk@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Адрес места работы:

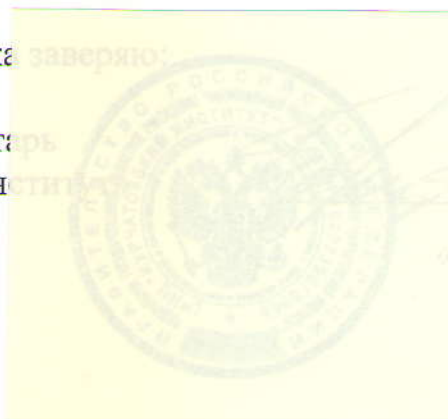
123182, г. Москва, площадь Академика И.В. Курчатова, д. 2,

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»), лаборатория функциональной энзимологии

Тел.: + 7 (499) 196-18-53; e-mail: Demidyuk_IV@nrcki.ru

Подпись И.В. Демидюка заверяю:

Главный ученый секретарь
НИЦ «Курчатовский институт»



К.Е. Борисов

«30» сентября 2024 г.