

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

В настоящее время существует серьезная проблема устойчивости многих патогенных штаммов к применяемым в клинической практике антибиотикам. В связи с этим актуальной задачей современной науки является разработка новых антибактериальных препаратов способных бороться с резистентными к антибиотикам штаммами бактерий, которые при этом не будут приводить к развитию лекарственной устойчивости.

Диссертационная работа Шестака Н.В. посвящена изучению рекомбинантного белка лизостафина из *Staphylococcus simulans*, а именно разработке методик определения его каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активности. Также в работе проведена оценка влияния метода очистки на активность лизостафина. Лизостафин относится к бактериальным лизинам и является перспективным кандидатом для разработки новых антибактериальных препаратов. При этом, систематических исследований его каталитической и других видов активности, а также оценки влияния метода очистки на свойства ранее проведено не было.

Представленная диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, обсуждение результатов, выводы и список литературы, состоящий из 200 статей и обзоров. Работа изложена на 139 страницах, проиллюстрирована 48 рисунками и 6 таблицами.

Во введении четко обозначены актуальность, цели и задачи работы, представлены научная новизна и практическая значимость, сформулирован личный вклад соискателя, перечислены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы достаточно объемный и содержит все необходимые данные для понимания механизма действия бактериальных лизинов. Описано строение бактериальных стенок, собраны литературные данные о структуре бактериальных лизинов в целом, особое внимание уделено лизостафину. Автором описаны существующие методы определения активности лизостафина и обозначены их возможные недостатки, описано влияние различных металлов на активность лизинов семейства M23, а также возможные способы очистки лизостафина.

Глава Материалы и методы содержит всю необходимую информацию об используемых в ходе проведения исследования реактивах и оборудовании, а также подробное описание методов получения и очистки рекомбинантных белков, определения концентрации лизостафина, определения его активности, получения белков с различными ионами металлов в активном центре. Кроме того, описан метод получения пептидогликановых оболочек клеток золотистого стафилококка, способ определения активности лизостафина против этих оболочек, восстановление активности лизостафина и другие экспериментальные методики, используемые в настоящей работе. Все методы описаны подробно, с указанием всех особенностей работы, что позволяет их легко воспроизвести и не оставляет сомнений в научной грамотности изложения настоящего исследования.

Глава результаты и их обсуждение содержит полную информацию о проведенных исследованиях, которая подкреплена соответствующими таблицами и рисунками. Результаты описаны хорошим научным языком, проведена соответствующая статистическая обработка полученных экспериментальных данных, что не вызывает никаких сомнений в правильности проведения настоящего исследования.

Среди основных результатов, полученных в ходе настоящей работы можно выделить следующее:

1. Разработан новый метод определения каталитической активности рекомбинантного лизостафина.
2. Разработаны новые методы для определения пептидогликанолитической и бактериолитической активности вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в активном центре.
3. Каталитическая, пептидогликанолитическая и бактериолитическая активность лизостафина зависит от типа металла в активном центре.
4. Оптимизирована методика очистки лизостафина.

Отмечу, что достоверность результатов не вызывает сомнений. Основные положения диссертации обоснованы, выводы логично вытекают из представленных результатов работы.

Подводя итог о результатах представленного исследования, стоит отметить, что научная новизна и практическая значимость проведенной Шестаком Н.В. работы не вызывают сомнений. Результаты могут быть интересны специалистам биотехнологического, биохимического и биомедицинского направлений.

Работа прошла необходимую апробацию. Материалы диссертации были опубликованы в 4 статьях в зарубежных рецензируемых научных журналах. Полученные экспериментальные данные были представлены на научных конференциях всероссийского и международного уровня.

Приведенные публикации и автореферат полностью отражают существо проделанной работы.

Диссертационная работа производит хорошее впечатление как объемом проведенного исследования, так и качеством планирования экспериментов. Очевидно, что работа имеет перспективы продолжения - прежде всего,

должны быть продолжены эксперименты по получению бактериальных лизинов из различных источников, а также определены их каталитические и кинетические характеристики с использованием разработанных в настоящей работе методов.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Однако работа содержит незначительное количество опечаток. Также при детальном прочтении возникли следующие замечания и рекомендации:

1. Лизостафин относится к достаточно большой группе протеаз M23, которая содержит довольно сильно различающиеся по первичной структуре белки. Возможно, настоящий обзор литературы был бы более полным, если бы в нем содержалась информация по первичной структуре изучаемого лизостафина, а также было бы проведено сравнение первичных структур протеаз M23 из различных источников.
2. В разделе методы, пункт 3.2.4. указано, что проводили очистку рекомбинантного лизостафина с 6xHis-tag с использованием катионообменного сорбента. Остается непонятным, для чего автор проводил очистку на катионообменном сорбенте для фермента с 6xHis-tag.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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 Шестак Никита Викторович заслуживает
присуждения ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, ведущий научный
сотрудник, заведующая лабораторией
молекулярной инженерии Федерального
исследовательского центра «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии
наук, Институт Биохимии имени А.Н. Баха

Пометун Анастасия Александровна


(подпись)

« 30 » сентября 2024 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (985) 815-39-56, e-mail: aapometun@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.04 Биохимия

Адрес места работы:

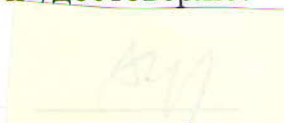
119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2,
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук, Институт Биохимии имени
А.Н. Баха, лаборатория молекулярной инженерии
Тел.: +7 (495) 660-34-30 доб. 425; e-mail: a.pometun@fbras.ru

Подпись сотрудника

ФИЦ Биотехнологии РАН Анастасия Александровна Пометун удостоверяю:

Ученый секретарь

ФИЦ Биотехнологии РАН



Орловский А.Ф.

« 30 » сентября 2024 г.