

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Растриги Николая Владимировича «Низкомолекулярные эффекторы лизоцима: влияние на активность фермента и его адсорбцию на бактериальных клетках», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Н.В. Растриги, представленная на защиту, посвящена экспериментальному изучению влияния различных факторов на эффективность лизиса бактериальных клеток лизоцимом. Лизоцимы различного происхождения – классические ферменты, деградирующие пептидогликан клеточных стенок. На их основе разработаны множество лекарственных и ветеринарных противомикробных и антисептических препаратов. В условиях использования в живых системах бактериолитическая активность лизоцима зависит от ряда факторов, таких как рН, температура и ионная сила. На активность фермента также оказывают действие компоненты окружающей среды, стимулирующие или ингибирующие бактериолитическое действие. Добавление эффекторов, усиливающих эффект фермента, может быть полезным для фармакологических целей. В данном исследовании в качестве эффекторов-активаторов лизиса клеток были выбраны глицин и заряженные аминокислоты. Экспериментальное подтверждение их влияния и преодоления с их помощью ингибирующего действия ионов кальция имеет актуальность и практическую значимость.

Степень новизны, обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Методическим достоинством диссертации Н.В. Растриги можно считать разработку единого алгоритма турбидиметрического измерения влияния

различных аддитивов на активность лизоцима в отношении бактериальных клеток. Снижение оптической плотности суспензии бактерий при действии целевого вещества вследствие осмотического лизиса клеток используется в качестве качественного доказательства противобактериального действия в течение многих десятилетий. Однако в диссертации Н.В. Растриги представлен математический аппарат для количественного выражения активности, который может использоваться для сравнения различных бактериолитических агентов, в присутствии дополнительных веществ. Разработанный алгоритм довольно удобен, хотя и не отражает всего разнообразия биологических механизмов потери жизнеспособности бактерий, которая не обязательно сопровождается лизисом клеток.

В контексте диссертационного исследования стандартизация методики позволила гармонизировать проведенные эксперименты и получить результаты, которые поддаются прямому сравнению. В работе впервые изучено сочетанное действие глицина, заряженных аминокислот и ионов кальция на лизис бактериальных клеток куриным и человеческим лизоцимами. Продемонстрирована связь между изменением сорбционных параметров человеческого и куриного лизоцимов на поверхности живых бактериальных клеток и активирующим действием эффекторов.

Достоверность и апробация результатов исследования

Проведённая работа идеологически целостна. Для достижения конечного результата был скомпонован обоснованный план исследований, разделенный на логичные экспериментальные этапы. Используемые Н.В. Растригой методы исследования обеспечили выполнение поставленных задач и статистическую значимость полученных данных. Совокупность экспериментальных результатов позволяет оценить работу Н.В. Растриги как законченный труд с обоснованными выводами и научно-практическими рекомендациями.

Основные положения и выводы диссертации отражены в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index», а также 3 публикациях в сборниках конференций, индексируемых в базе «Scopus». Апробация работы проведена в виде представления на ряде научных конференций. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы Н.В. Растриги «Низкомолекулярные эффекторы лизоцима: влияние на активность фермента и его адсорбцию на бактериальных клетках» отражают содержание диссертации.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация Н.В. Растриги построена по традиционному плану. Материал изложен на 171 странице текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список использованных литературных источников (356 ссылок). Работа иллюстрирована 16 таблицами и 41 рисунком.

Во введении автором обоснована цель исследований и определены задачи, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы (43 страницы, 8 глав) представляет собой изложение современных данных о строении клеточной стенки бактерий, типах ферментов, осуществляющих деградацию пептидогликана, низкомолекулярных эффекторах, влияющих на активность таких ферментов, методах измерения активности бактериолитических ферментов. Подробно рассмотрены данные о структуре и биологии действия двух белков лизоцимов куриного яйца и человека, а также структуре целевых микроорганизмов, *Escherichia coli* и *Priestia megaterium*. Обзор литературы характеризуется широтой рассмотренного материала, хорошей структурированностью, живым и доступным языком изложения, а также наглядными иллюстрациями. Например, обсуждаются такие дискуссионные свойства лизоцимов, как их противовирусное, иммуномодулирующее и

противоопухолевое действие. Обзор литературы диссертационной работы Н.В. Растриги может служить хорошим справочным материалом для специалистов, работающих в области микробиологии и механизмов действия противомикробных ферментов.

Изложение методов исследования и статистической обработки в главе «Материалы и методы» дано детально и чётко, не вызывает сомнений возможность повторения исследований и воспроизведения результатов с использованием приведенных в диссертации протоколов.

Часть диссертации «Результаты и обсуждение» разделена на 17 глав. Идеологически они посвящены вопросам влияния различных аминокислот их сочетаний на собственно лизис бактериальных клеток под действием лизоцима (1-7) и адсорбции лизоцима на поверхности клеток (10-16). Сильной стороной диссертации является единый методический подход. Имеется аппарат расчета активности исследуемого бактериолитического вещества. Проведено множество статистически достоверных экспериментов. Таким образом, не возникает сомнений в доказательности полученных результатов.

Диссертантом предлагаются гипотеза о том, что увеличение скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии аминокислот связано с изменением константы десорбции лизоцима с поверхности бактериальных клеток. Предложена комбинация из пяти аминокислот (1,5 мМ глицина, а также глутамата, лизина, гистидина и аргинина в концентрациях по 5 мМ), которая усиливает антибактериальные свойства как человеческого, так и куриного лизоцимов на клетки бактерий нескольких родов и понижает минимальную бактерицидную концентрацию лизоцима.

В целом, диссертационная работа Н.В. Растриги отличается логичной схемой проведенных исследований, качественными таблицами и иллюстрациями, поясняющими результаты экспериментов. Выводы работы в целом соответствуют поставленным в начале работы задачам, и позволяют считать основную цель работы достигнутой. Научные положения, выносимые на защиту, в полной

степени отражены в результатах работы и соответствуют паспорту заявленной специальности 1.5.4. – биохимия.

При изучении текста диссертации возникает вопрос о применимости расчетов сорбционной емкости бактериальной клетки по отношению к ионам кальция и непродуктивно сорбированных молекулам лизоцима. Не совсем доказателен тезис об участии липополисахаридов в адсорбции белковых молекул и не принимается во внимание то, что у грамотрицательных бактерий, помимо пептидогликана имеется также внешняя мембрана.

Также в ряде случаев обсуждается использование лизоцима *in vivo* и его взаимодействие с биологическими жидкостями. Все известные оппоненту препараты на основе лизоцима предназначены для поверхностного применения, где факторы такого взаимодействия не играют принципиальной роли. Если рассматривается пероральное или другое внутреннее применение, необходимо учитывать множество других взаимодействий, либо специфически обозначать ограничения *in vivo* систем.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств работы, однако важны для идеологического продолжения этого интересного и важного проекта.

Заключение

Диссертационное исследование **Растриги Николая Владимировича** «Низкомолекулярные эффекторы лизоцима: влияние на активность фермента и его адсорбцию на бактериальных клетках», выполненное под руководством д.х.н. Левашова Павла Андреевича, является завершенной научно-квалификационной работой.

По актуальности, новизне, методическому уровню и практической значимости результатов, объему проведенных исследований, диссертационная работа полностью соответствует паспорту специальности 1.5.4. - «биохимия» по химическим наукам и требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова,

Официальный оппонент,
Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией
молекулярной биоинженерии
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Государственный научный центр Российской Федерации Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН» (ГНЦ ИБХ РАН),
доктор химических наук, член-корреспондент РАН

22.04.2025

Контактные данные:
адрес места работы: 117991, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
тел.: +7 (495) 335-55-88, e-mail: kmi@ibch.ru.

Учёный секретарь ГНЦ ИБХ РАН
доктор физико-математических наук, профессор

E