

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Червинец Юлии Вячеславовны на диссертационную работу Сенягина Александра Николаевича на тему: «Исследование антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai на условно – патогенные и непатогенные микроорганизмы», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – микробиология (медицинские науки)

Актуальность избранной темы

На сегодняшний день известно, что L-лизин- α -оксидаза (LO) – является ферментом, обладающим теоретической антимикробной активностью широкого спектра действия, продуцируемым грибами рода *Trichoderma*.

В настоящее время фермент L-лизин- α -оксидаза в равной степени привлекает внимание исследователей и биологического, и медицинского направлений. В 2015 году была описана противоопухолевая активность фермента L-лизин- α -оксидазы по отношению к мышинным и человеческим моделям опухолей, включающих ксенотрансплантаты опухолей толстого кишечника человека линий HCT 116, LS174T, T47D. Кроме противоопухолевой активности при изучении фермента была выявлена активность по отношению к различным микроорганизмам. В 2014 году выявлено действие фермента на микоплазмы - двух видов представителей семейства *Mycoplasmataceae*: *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma fermentans* и одного вида представителя семейства *Aholeplasmataceae*: *Aholeplasma laidlawii*. В 2016 году выявлено подавление под действием этого фермента репликации вируса клещевого энцефалита человека в перевиваемой культуре клеток почек эмбриона свиньи (SPEV) и почки эмбриона зеленой мартышки (Vero, клон E6). В 2015 году определили ингибирующее действие L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma harzianum* Rifai в отношении фитопатогенов.

Актуальность выбранной темы исследования определяется тем, что оценка антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы в отношении прокариот и его ингибирующего действия на формирование биопленок бактериями позволит расширить возможности использования знаний об антагонистическом действии фермента в прикладных целях, что может быть использовано в качестве потенциального действующего вещества фармацевтического препарата для лечения и профилактики инфекционных заболеваний бактериальной природы.

Таким образом актуальность диссертационного исследования Сенягина А.Н., посвященного исследованию антагонистического действия l-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai на условно – патогенные и непатогенные микроорганизмы не вызывает сомнений.

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

В диссертационной работе, автором впервые было проведено культивирование продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 в лабораторных условиях с оценкой оптимальных параметров продукции фермента L-лизин- α -оксидазы (далее LO) и предложена упрощенная схема фракционирования культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180, с последующим выделением фермента LO. Впервые разработан и применен новый метод определения активности фермента LO в культуральной жидкости продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 с использованием реактива тетраметилбензидина.

Впервые установлено, что наибольшую активность фермент LO проявляет в отношении грамположительных бактерий, в сравнении с грамотрицательными бактериями и неактивен в отношении дрожжевых грибов из порядка *Saccharomycetales*. Впервые установлено, что концентрат культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 и гомогенный фермент L -лизин – α – оксидаза (hLO) обладают противомикробным действие в отношении полирезистентных уropатогенных кишечных палочек (УПКП).

Впервые было установлено, что минимальная ингибирующая концентрация hLO для изучаемых групп микроорганизмов различна. Впервые было определено, что фермент LO способен подавлять формирование биопленок условно-патогенными и непатогенными микроорганизмами на 30 – 50%. Впервые установлен анафилактический индекс фермента LO, который составил $1,3 \pm 0,2$.

Достоверность полученных результатов диссертационной работы Сенягина А.Н. не вызывает сомнений и определяется методологически верифицированными исследованиями, выполненными с применением современных бактериологических, ультрафильтрационных, молекулярно-генетических, электронно-микроскопических, иммунологических, аллергологических, биологических, а также статистических методов. Размер выборок, использованных в работе, был достаточным для получения статистически значимых данных, и методы обработки данных соответствовали общепринятым стандартам.

Степень достоверности и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается значительным объемом проведенных исследований и репрезентативностью выборок экспериментального материала, использованием современных апробированных методов, сертифицированного и поверенного оборудования, и адекватной статистической обработкой. Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, обоснованы и отражают проведенные исследования.

Все это позволяет заключить, что достоверность и новизна исследования, а также полученных соискателем результатов, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Результаты исследования, полученные Сенягиным А.Н., расширяют теоретическое представление о роли *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 в продукции фермента L-лизин- α -оксидазы (далее LO). Изучение оптимальных условий для культивирования *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180, при которых

достигается максимальная продукция и активность фермента LO в культуральной жидкости, позволят модифицировать и улучшить подходы получения фермента в лабораторных условиях. Кроме того, усовершенствование метода определения активности фермента LO, путем замены канцерогенного компонента на биобезопасный тетраметилбензидин позволило повысить чувствительность метода и обеспечить безопасность проведения реакции. Разработанный метод может быть адаптирован и применен при оценке активности других ферментов.

Доказанная экспериментальным путем антагонистическая активность LO в отношении условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов, а также его активность в отношении ингибирования формирования биопленок этими микроорганизмами позволят дополнить представления о ферменте. В *опытах in vitro* и *in vivo* определено, что иммунные свойства фермента сопоставимы с таковыми у зарегистрированных ферментных препаратов, что является важным для последующей разработки лекарственного препарата на основе LO.

Результаты исследования используются в учебно-методических материалах кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко МИ РУДН при подготовке студентов по специальности «Лечебное дело», «Стоматология», «Фармация» в рамках дисциплин: «Микробиология, вирусология», «Микробиология, вирусология – полости рта», «Микробиология».

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация, выполненная Сенягин Александром Николаевичем, соответствует пунктам 7, 11 паспорта научной специальности 1.5.11. – Микробиология: п.7 «Свойства отдельных видов микроорганизмов, как патогенных, так и населяющих организм человека, а также видов, используемых в качестве пробиотиков и продуцентов биотехнологических продуктов.» п.11 «Закономерности биосинтеза антибактериальных субстанций бактериального происхождения (антибиотики и бактериоцины), молекулярные механизмы чувствительности бактерий к антибиотикам, методы фенотипического и генотипического исследования механизмов лекарственной

устойчивости, фундаментальные основы их преодоления».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Материалы диссертации полно представлены в печати. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 печатных работ, 4 из них в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации к защите. Также 5 представлены в сборниках материалов конференций.

Структура и содержание диссертации

Диссертация, изложена на 181 страницах машинописного текста, написана в традиционной форме и состоит из введения, обзора литературы, подробного описания материалов и методов, использованных в работе, семи глав собственных исследований, заключения и выводов, содержит 24 таблицы и 44 рисунка. Список литературы включает 9 отечественных и 167 зарубежных источников.

Обзор литературы информативен, в нем подробно освещены необходимые для понимания сути работы факты и гипотезы. Цели и задачи сформулированы четко и корректно. В разделе «Материалы и методы» дана подробная информация о примененных методиках, а также методы статистического анализа результатов исследования.

Результаты собственных исследований последовательно изложены в семи главах. Во второй главе описан дизайн диссертационного исследования поэтапно в виде схем и доступных для понимания рисунков.

Третья глава диссертационного исследования посвящена методам культивирования *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 на различных питательных средах, этапам очистки продуцента фермента, а также выделение фермента и подсчет молекулярной массы L-лизин- α -оксидазы в лабораторных условиях в концентрате культуральной жидкости в сравнении с гомогенным контрольным ферментом.

В четвертой главе описан модифицированный метод определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы на планшетном спектрофотометре и

подбор оптимальных условий реакций. Новый метод, основанный на использовании тетраметилбензидина (ТМБ), обеспечивает повышение точности определения фермента в 10 раз, обладает повышенной чувствительностью и обеспечивает возможность определения активности фермента у штаммов-продуцентов не только с выраженной активностью LO, но и у тех, где эта активность ранее не определялась.

В пятой главе автором было показано, что фермент L – лизин - α - оксидаза обладает в 2 раза большей антагонистической активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, по сравнению с грамотрицательными, на дрожжевые грибы видимого действия установлено не было. Фермент и культуральная жидкость также имели воздействие на полирезистентные к антибиотикам уропатогенные кишечные палочки. Для подтверждения эффективности действия образцов на полирезистентные кишечные палочки был высчитан индекс лекарственной мультирезистентности для 70 штаммов и сопоставлен с эффективностью образцов. Методом микропланшетного микрокультивирования выявлено, наибольшей способностью к образованию биопленок обладают *Pseudomonas aeruginosa* 3057 и *Staphylococcus aureus* ATTC 6538. Было показано с помощью микропланшетного микрокультивирования а также сканирующей электронной микроскопии, что до 24 ч. культивирования концентрат культуральной жидкости или раствор гомогенного фермента может подавить образование биопленок практически у всех исследуемых микроорганизмов.

Шестая глава посвящена исследованию цитотоксического действия фермента L-лизин- α -оксидазы по отношению к эукариотическим клеткам. Исследуемый фермент L-лизин- α -оксидаза не проявляет цитопатическое действие по отношению к культуре эукариотических клеток Vero E6 в концентрации $6 \cdot 10^3$ кл./лунку

Седьмая глава включает в себя описание серологического экспресс метода качественного и количественного определения фермента L-лизин- α -оксидазы, а также исследование иммуногенных и аллергологических свойств

фермента на биологических моделях. Выявлено, что интенсивность иммунного ответа к L-лизин- α -оксидазе не превышает или даже несколько ниже других ферментных препаратов, разрешенных к применению. L-лизин- α -оксидаза, нативная и модифицированная, обладает слабой аллергенной активностью при парентеральном введении в дозе 35 ЕД/кг не больше, а в ряде случаев даже слабее других ферментных препаратов, разрешенных к применению.

Результаты изучения анафилактической активности L-лизин- α -оксидазы в дозе 35 ЕД/кг в опытах *in vivo* и *in vitro* указывают на слабый аллергенный потенциал фермента.

Главы, посвященные собственным исследованиям, хорошо иллюстрированы 41 рисунком, 21 таблицей и содержат всю необходимую для анализа и оценки информацию.

В заключении аргументированы основные научные положения. Содержание работы соответствует поставленной цели.

Выводы и практические рекомендации логично следуют из поставленных задач и соответствуют основным положениям диссертации, полностью отражают результаты исследования, отличаются четкостью формулировок и обоснованностью.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат соответствует стандартам ГОСТ 7.0.11-2011, полностью отражает содержание работы, положения, выносимые на защиту и выводы диссертации.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

Диссертационная работа Сенягина А.Н. выполнена на высоком уровне.

1. *Замечания по тексту.* Замечаний по тексту не обнаружено.
2. *Замечания к рисункам.* Замечаний по рисункам не обнаружено.
3. *Вопросы.*
 - Как Вы думаете, почему фермент L – лизин - α – оксидаза не воздействует на дрожжевые грибы рода *Candida*?

- Изучали ли Вы противовирусную активность фермента L – лизин - α – оксидазы?

Заключение

Диссертационная работа Сенягина Александра Николаевича «Исследование антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai на условно – патогенные и непатогенные микроорганизмы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. Микробиология (медицинские науки), является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи по оценке антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы в отношении прокариот и его ингибирующего действия на формирование биопленок бактериями, что имеет существенное значение для микробиологии, включая использование фермента L-лизин- α -оксидазы в качестве потенциального действующего вещества фармацевтического препарата для лечения и профилактики инфекционных заболеваний.

Таким образом, диссертационная работа Сенягина Александра Николаевича «Исследование антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai на условно – патогенные и непатогенные микроорганизмы» по своей актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объем проведенных исследований соответствует требованиям п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 28.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 № 1382), предъявляемым к кандидатским

диссертациям, а ее автор *Сенягин Александр Николаевич*, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11. – Микробиология.

заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Тверской государственной медицинской академии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

170100, Тверь, ул. Советская, 4

тел.: 8 (4822)34-55-98

e-mail: julia_chervinec@mail.ru

доктор медицинских наук, профессор

Червинец Юлия Вячеславовна

Подпись Червинец Юлии Вячеславовны заверяю

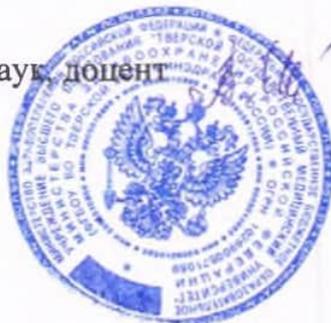
Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Тверской
государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

170100, Тверь, ул. Советская, 4

тел.: +7(4822)32-17-79

e-mail: info@tvvgmu.ru

доктор медицинских наук, доцент



Шестакова Валерия Геннадьевна

14.03.2025