

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента Краевой Людмилы Александровны на диссертационную работу Сенягина Александра Николаевича на тему: «Исследование антагонистического действия L-лизин- $\alpha$ -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

Проблема антибиотикорезистентности бактерий является одной из наиболее важных в здравоохранении. Количество полирезистентных штаммов микроорганизмов постоянно увеличивается. При этом устойчивость к антибактериальным препаратам все чаще формируют условно-патогенные микроорганизмы, такие как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и другие. Процесс лечения пациентов значительно усложняется из-за способности многих бактерий формировать биопленки на поверхности слизистых оболочек и/или поверхностях катетеров, зондов, эндопротезов. Причем, при переходе из планктонных форм в биопленочную бактерии становятся невосприимчивыми к действию антибактериальных препаратов.

В диссертационной работе Сенягина А. Н. рассмотрен один из возможных подходов к преодолению проблемы антибиотикорезистентности и формирования биопленок у микроорганизмов, представляющих особый интерес в области клинической медицины: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* и других.

В настоящее время фермент L-лизин- $\alpha$ -оксидаза привлекает внимание исследователей разных направлений. Была неоднократно описана противоопухолевая активность фермента в отношении животных и человеческих моделей опухолей.

В настоящее время в сельском хозяйстве широко используется препарат для борьбы с фитопатогенами на основе грибов рода *Trichoderma*. Противомикробное действие основано на наличии у гриба большого разнообразия соответствующих метаболитов. А в 2015 году было продемонстрировано антагонистическое действие самого фермента L-лизин- $\alpha$ -оксидазы гриба *Trichoderma harzianum* Rifai в отношении инфекционных агентов растений.

В 2014 году в исследованиях было продемонстрировано антагонистическое действие в отношении представителей семейства *Mycoplasmataceae* и *Aholeplasmataceae*.

Актуальность данной диссертационной работы заключается в том, что оценка антагонистического действия L-лизин- $\alpha$ -оксидазы по отношению к непатогенным и условно-патогенным микроорганизмам, а также ингибирующего влияния фермента на образование биопленок бактериями, создаст новые возможности для использования полученных знаний в практических целях. Это может открыть перспективы для разработки потенциального активного компонента фармацевтического препарата, предназначенного для лечения и профилактики инфекционных заболеваний бактериальной природы.

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

В диссертационном исследовании автором впервые были подобраны оптимальные условия культивирования продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 с целью получения максимальной продукции фермента L-лизин- $\alpha$ -оксидазы (далее LO). Предложена упрощенная схема фракционирования культуральной жидкости *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 с последующим выделением фермента LO.

Впервые разработан и использован модифицированный метод определения активности фермента LO в культуральной жидкости продуцента

*Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 с использованием биобезопасного реактива тетраметилбензидина.

Впервые была установлена минимальная ингибирующая концентрация LO в отношении условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов; при этом было показано, что минимальная ингибирующая концентрация фермента зависит от штамма бактерий. Наибольшая антагонистическая активность была продемонстрирована в отношении грамположительных бактерий. Вместе с тем было показано отсутствие антагонистической активности в отношении дрожжевых грибов.

Впервые была изучена ингибирующая активность на процесс биопленкообразования, при этом максимальный подавляющий эффект достигался при внесении тестируемого фермента в начале эксперимента. Стоит отметить, что способность подавлять образование биопленок для некоторых штаммов достигала 100%.

Диссертационная работа Сенягина А.Н. выполнена с применением современных микробиологических, ультрафильтрационных, молекулярно-генетических, культуральных, иммунологических, аллергологических, биологических, статистических методов.

Степень достоверности результатов диссертационного исследования подтверждается репрезентативным количеством выборок, современными методами исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа. Основные положения, выводы и рекомендации, сформулированные автором, обоснованы и отражают проведенные исследования.

### **Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы**

Расширены теоретические знания о ферменте L-лизин- $\alpha$ -оксидазе как об одном из продуцентов *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180. Были получены данные об оптимальных условиях культивирования продуцента, при которых

достигается максимальная продукция и активность фермента LO в культуральной жидкости. Кроме того, был модифицирован метод определения активности фермента LO, в результате чего канцерогенный компонент был заменен на безопасный тетраметилбензидин, что в свою очередь позволило повысить чувствительность метода. Данный метод может быть применен при оценке активности других ферментов.

Материалы настоящей работы демонстрируют антагонистическую активность LO в отношении условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов, ингибирующее действие в отношении биопленкообразования этих микроорганизмов. LO в исследованиях *in vitro* и *in vivo* продемонстрировал низкие иммунологические свойства, что показывает возможность разработки лекарственного препарата на основе LO.

Особую значимость приобретают результаты исследования автора в связи с возможностью в будущем использовать препараты на основе фермента LO для лечения онкологических больных, так как у таких пациентов на фоне снижения функциональной активности иммунитета часто развиваются инфекционные процессы, вызванные условно-патогенными и даже непатогенными бактериями.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебно-методический процесс 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 Сениягин 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 в полном объеме представлены в печати. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 печатных работ, 4 из них в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации к защите. Остальные 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, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, содержит 24 таблицы и 44 рисунка. Список литературы включает 9 отечественных и 167 зарубежных источников.

В обзоре литературы изложены необходимые для понимания актуальности работы факты. Цели и задачи сформулированы лаконично и корректно. В разделе «Материалы и методы» изложена методология исследования, все методы являются современными и используются в научных работах.

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования изложены в семи главах. Во второй главе представлен дизайн диссертационного исследования в виде схем и рисунков.

Третья глава диссертационного исследования посвящена методам культивирования продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180, выделения фермента L-лизин- $\alpha$ -оксидазы и его очистки.

В четвертой главе приведено описание усовершенствованного метода определения активности фермента L-лизин- $\alpha$ -оксидазы, обеспечивающего повышение точности и обладающего повышенной чувствительностью.

Пятая глава посвящена антагонистической активности в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, с более выраженным эффектом в отношении первых. На дрожжевые грибы видимого действия установлено не было.

В шестой главе автор продемонстрировал отсутствие цитотоксического действия фермента L-лизин- $\alpha$ -оксидазы по отношению к эукариотическим клеткам клеточной линии Vero E6.

Седьмая глава посвящена описанию исследований иммуногенных и аллергологических свойств фермента на биологических моделях. В ходе экспериментов на лабораторных животных было выявлено, что фермент L-лизин- $\alpha$ -оксидаза обладает слабой иммунологической активностью.

Главы, описывающие собственные исследования, дополнены 41 рисунком, 21 таблицей, что упрощает оценку полученных результатов.

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 полностью отражает основные результаты и содержание 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 нет.
3. *Вопросы.*

- Как Вы думаете, почему фермент L – лизин -  $\alpha$  – оксидаза оказывал большее влияние на бактерии с более высоким индексом резистентности к антибиотикам?
- Как Вы считаете, с чем связана более высокая активность гомогенного фермента в сравнении с концентратом культуральной жидкости продуцента?
- Как Вы полагаете, с чем связана более высокая активность L – лизин -  $\alpha$  – оксидазы в отношении грамположительных бактерий в сравнении с грамотрицательными?

### Заключение

Диссертационная работа Сенягина Александра Николаевича «Исследование антагонистического действия L-лизин- $\alpha$ -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), выполненной под руководством Подопригора Ирины Викторовны, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи - изучение антагонистического действия L-лизин- $\alpha$ -оксидазы в отношении условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов, а также ингибирующего действия на формирование биопленок бактериями, что позволяет рассматривать фермент L-лизин- $\alpha$ -оксидазу в качестве потенциального действующего вещества фармацевтического препарата для лечения и профилактики инфекционных заболеваний бактериальной природы.

Таким образом, диссертационная работа Сенягина Александра Николаевича «Исследование антагонистического действия L-лизин- $\alpha$ -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 лабораторией медицинской бактериологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14

тел. +7 (812) 644-63-17

e-mail: [lykraeva@yandex.ru](mailto:lykraeva@yandex.ru)

доктор медицинских наук, доцент

Краева Людмила Александровна

Подпись Краевой Людмилы Александровны заверяю

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

197101, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14

тел. +7 (812) 644-63-17

e-mail: [pasteur@pasteurorg.ru](mailto:pasteur@pasteurorg.ru)

кандидат медицинских наук



Трифоновна Галина Федоровна

19.03.2025г.