

Заключение комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по кандидатской диссертации Сениягина Александра Николаевича на тему «Исследование антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai на условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11 – микробиология

Научный руководитель:

Подопригора Ирина Викторовна – к.м.н. (03.02.03 Микробиология), доцент, заведующая кафедрой микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»).

Диссертационная работа Сениягина А.Н., соответствует специальности: 1.5.11 – микробиология (медицинские науки).

Работа посвящена исследованию антагонистического действия фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 по отношению к условно-патогенным и непатогенным микроорганизмам, в том числе и к УПКП и дрожжевым грибам рода *Candida*, определению минимальной ингибирующей концентрации фермента для ряда условно-патогенных и непатогенных микроорганизмов, влиянию фермента на процессы биопленкообразования микроорганизмами и изучению иммунных и цитотоксических свойств L-лизин- α -оксидазы на биологических моделях млекопитающих и клеточной линии с целью потенциальной разработки антибактериального препарата широкого спектра действия, улучшению метода определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы путем модификации хромогенной среды за счет замены орто-дианизидингидрохлорид на тетраметилбензидин для обеспечения безопасности оператора.

В ходе диссертационного исследования была произведена наработка и очистка фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 путем культивации в смешанном режиме и последующая очистка с использованием метода ультрафильтрации и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Установлено выраженное антагонистическое действие фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 по отношению как к ряду грамположительных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* 4785, *Staphylococcus simulans* 5882, *Streptococcus hominis* 19, *Streptococcus agalactiae* – 3984, *Streptococcus mutans* 21, *Kocuria rhizophila* 1542, *Lactobacillus acidophilus* NK 1, *Limosilactobacillus fermentum* 219073, *Enterococcus faecalis* 5960, *Enterococcus avium* 1669, так и грамотрицательным микроорганизмам: *Escherichia coli* - M17; *Klebsiella pneumoniae* 1449, *Klebsiella oxytoca* 3003, *Enterobacter cloacae* 6392, *Achromobacter xylosoxidans* 4892, *Acinetobacter baumannii* 5841, *Citrobacter freundii* 426, *Moraxella catarrhalis* 4222, *Morganella morganii* 1543, *Proteus mirabilis* 1543, *Pseudomonas aeruginosa* 3057, *Serratia marcescens* 6441, включая 70 штаммов УПКП и дрожжевые грибы из порядка *Saccharomycetales*: *Candida albicans* subsp. 3. В результате исследования наибольшую активность фермент L-лизин- α -оксидаза проявлял в отношении грамположительных бактерий, представителей родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* (17 – 24 мм – для гомогенного фермента, от 9 мм до 16 мм для концентрата культуральной жидкости), в сравнении с грамотрицательными бактериями представителями семейства *Enterobacteriaceae* (11 – 16 мм – для гомогенного фермента, 6 – 10 мм для концентрата культуральной жидкости) и был неактивен в отношении дрожжевых грибов рода *Candida*.

В результате проведенных исследований впервые было установлено влияние фермента L-лизин- α -оксидазы (hLO) и концентрата культуральной жидкости продуцента (кКЖ) *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 на процесс биопленкообразования у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Установлено, что подавление биопленкообразования для

фермента – процесс, зависимый от вносимой концентрации и времени внесения. При внесении образцов фермента или культуральной жидкости продуцента на ранних этапах формирования биопленки (от начала эксперимента до 24 часа культивации) наблюдалось подавление процесса биопленкообразования практически до 100% УПКП (*E. coli* subsp., среднее значение для 70 штаммов) кКЖ 91%, hLO 99%; *E. coli* - M17 – кКЖ 91%, hLO 99%; *E. coli* ATCC 2582 – кКЖ 93%, hLO 100%; *E. faecalis* 5960 – кКЖ 86%, hLO 95%; *E. avium* 1669 – кКЖ 85%, hLO 94%; *E. cloacae* 6392 – кКЖ 83%, hLO 98%; *M. catarrhalis* 4222 – кКЖ 78%, hLO 86%; *M. morgani* 1543 – кКЖ 66 %, hLO 71%; *P. mirabilis* 1543 – кКЖ 81%, hLO 96%; *P. aeruginosa* 3057 – кКЖ 70%, hLO 82%; *S. aureus* 4785 – кКЖ 82%, hLO 96%; *S. aureus* ATTC 6538 – кКЖ 80%, hLO 94%; *S. simulans* 5882 – кКЖ 78%, hLO 91%; *S. hominis* 19 – кКЖ 90%, hLO 95%; *S. agalacticae* 3984 – кКЖ 90%, hLO 95%; *S. mutans* 21 – кКЖ 92%, hLO 98%. При этом значительно меньший эффект был характерен для штаммов *K. pneumoniae* 1449 – кКЖ 22%, hLO 52%; *K. oxytoca* 3003 – кКЖ 35%, hLO 61%. На дрожжевые грибы *C. albicans* subsp., существенного эффекта оказано не было – кКЖ 0%, hLO 12%. Также установлено, что при более позднем внесении (24 часа от начала эксперимента и более) эффективность подавления биопленкообразования падала практически до нуля.

Была произведена морфологическая оценка структурных изменений бактериальных культур и структурной целостности биопленки при внесении фермента L-лизин- α -оксидазы и концентрата культуральной жидкости продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 в среду культивирования микроорганизмов с использованием сканирующей электронной микроскопии. К наиболее часто встречающимся аномалиям можно отнести полиморфизм, неполное расхождение клеток при делении, наличие аморфных субстанций на поверхности клеток, предположительно являющихся лизированными фрагментами внеклеточного матрикса биопленки или выпотом клеточного содержимого через цитоплазматическую мембрану.

В ходе исследования иммунных свойств фермента были использованы такие биологические модели как: клеточная линия Vero E6, 1, кролики породы «советская шиншилла», возраст 80 – 85 дней, масса 2,5 – 3 кг, морские свинки породы «Агути», возраст 5 недель, масса 230 – 250 г, мыши линии СВА (СВА х С57В1, SHR), возраст 2 недели, масса 18 – 20 г. Установлено низкое цитотоксическое действие фермента на клеточную линию Vero E6 и подтверждено, что L-лизин- α -оксидаза обладает низкими иммунными свойствами, сопоставимыми с таковыми у зарегистрированных медицинских препаратов из группы ферментов.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что проведенные исследования антимикробных свойств фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 доказывают перспективность направления по изучению антагонизма в микробных сообществах и поиску новых антибактериальных субстанций микробного происхождения, обладающих выраженным антагонистическим действием, как одного из приоритетных направлений стратегии борьбы с антибиотикорезистентностью. Получены новые данные о антагонистическом действии фермента L-лизин- α -оксидазы и концентрата культуральной жидкости продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 по отношению к условно-патогенным и непатогенным микроорганизмам и это доказывает, что потенциальное использование фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 в сочетании с антибиотиками или постбиотиками открывает новые горизонты в разработке комбинированных стратегий лечения инфекций, вызванных полирезистентными патогенами.

Практическая значимость работы заключается в том, что усовершенствованный метод определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 позволяет проводить качественное и количественное индикацию его наличия в культуральной жидкости продуцента без потенциальных рисков для оператора.

При изучении *in vitro* и *in vivo* определено, что иммунологические свойства, включая сенсibiliзирующую активность, исследуемого фермента сопоставимы с таковыми у зарегистрированных ферментных препаратов.

Доказанная эффективность ингибирования биоплёнок при внесении фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 позволяет применять его для

создания антимикробных покрытий на поверхностях медицинских изделий, таких как катетеры, эндопротезы, хирургические инструменты, что будет способствовать предотвращению инфекционных осложнений, вызванных микроорганизмами, формирующими биоплёнки.

Низкий уровень аллергенности фермента L-лизин- α -оксидазы штамма продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F – 180 (анафилактический индекс - $1,3 \pm 0,2$) обосновывает его безопасность для клинического применения, создавая предпосылки для разработки инновационных терапевтических препаратов с минимальными побочными эффектами.

Результаты диссертационного исследования используются в учебно-методических материалах кафедры микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института ФГАОУ РУДН им. Патриса Лумумбы при подготовке студентов по специальности «Лечебное дело», «Стоматология», «Фармация» в рамках дисциплин: «Микробиология, вирусология», «Микробиология, вирусология – полости рта», «Микробиология» и в учебно-методических материалах кафедры микробиологии и вирусологии Института профилактической медицины им. З. П. Соловьева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России при подготовке студентов по специальности «Лечебное дело», «Стоматология», «Педиатрия», «Фармация» (акт внедрения от 26 сентября 2024 года ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы и акт внедрения от 3 октября 2024 года ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России).

Диссертационная работа выполнена с использованием совокупности современных и апробированных методов исследований. Достоверность полученных результатов основана на достаточном объёме выборки исследуемых образцов, применении современных и традиционных микробиологических методов. Проведенное системное микробиологическое исследование взаимодействия штаммов микроорганизмов и исследуемого фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 позволило получить данные, сопоставимые с данными других исследователей в сфере микробиологии. Научные положения и выводы логически вытекают из результатов, полученных в ходе диссертационной работы.

По объёму проведенных исследований, их новизне и практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.11 – микробиология.

Комиссия не установила в диссертации и автореферате фактов некорректного заимствования материалов без ссылок на первоисточники. Отчет о проверке на заимствования с помощью системы «Антиплагиат» на сайте www.antiplagiat.ru показал, что оригинальность текста составляет 94,59%, самоцитирование – 1,53%, цитирование 1,39%, совпадения – 3,49%.

Диссертация содержит достоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых изданиях и 5 в материалах конференций (тезисы).

Диссертация соответствует профилю Диссертационного совета 64.1.004.01.

В качестве **ведущей организации** предлагается утвердить Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России). Согласие ведущей организации имеется.

В качестве **официальных оппонентов** предлагаются:

- Червинец Юлия Вячеславовна - доктор медицинских наук, профессор (03.02.03 – Микробиология), заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Тверской государственной медицинской академии Министерства здравоохранения Российской Федерации
- Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, доцент (03.02.03 – Микробиология), заведующая лабораторией медицинской бактериологии федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский

институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Согласия оппонентов имеются.

Заключение: комиссия Диссертационного совета 64.1.004.01. рекомендует диссертацию Сениягина Александра Николаевича на тему «Исследование антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma Harzianum* Rifai на условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы» по специальности: 1.5.11 – микробиология (медицинские науки) к приему к защите.

Заключение подготовили члены комиссии Диссертационного совета 64.1.004.01:

Председатель:

Руководитель отдела медицинской биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
доктор биологических наук, доцент



Е.А. Воропаева

Члены комиссии:

Заместитель директора по медицинской биотехнологии
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,
Ученый секретарь
доктор медицинских наук, профессор



О.Ю. Борисова

Профессор кафедры микробиологии, вирусологии ИПМ им.
З.П. Соловьева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
доктор медицинских наук, профессор



Б.А. Ефимов

Заведующий отделом клинической фармакологии с центром
клинических исследований ГКБ № 67 им. Л.А. Ворохобова
ДМЗ,
доктор медицинских наук, профессор



С.Д. Митрохин