

УТВЕРЖДАЮ:

Первый проректор – проректор
по научной работе
ФГАОУ ВО РУДН
им. Патриса Лумумбы
д.м.н., профессор,
чл. – корр. РАН
Костин А. А.



202 4 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6)

Диссертация Сенягина 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) выполнена на кафедре микробиологии имени В. С. Киктенко Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

В период подготовки диссертации и по настоящее время соискатель Сенягин Александр Николаевич работал и работает в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», кафедра микробиологии имени В. С. Киктенко Медицинского института, в должности старшего преподавателя.

В 2018 г. Сенягин Александр Николаевич окончил Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего

образования «Российский университет дружбы народов» по специальности лечебное дело. В период 2018 – 2022 гг. проходил обучение аспирантуре в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» при кафедре микробиологии им. В. С. Киктенко по специальности 1.5.11 Микробиология, биологические науки (диплом № 107724 6101276 Регистрационный номер 0141 от 30 июня 2022 года).

Для завершения диссертационной работы, апробации и получения заключения организации Сенягин Александр Николаевич был прикреплен в качестве соискателя к кафедре микробиологии имени В. С. Киктенко Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (протокол заседания Ученого Совета медицинского института ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы № 0301-08/09 от 16 мая 2024 г.)

Справка об обучении № 0803 от 03 декабря 2024 г. выдана Федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Научный руководитель – Подопригора Ирина Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», кафедра микробиологии имени В. С. Киктенко Медицинского института, заведующая кафедрой.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертация Сенягина А. Н. "Исследование антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai на условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы" является законченным научным исследованием, выполненном на должном и современном методическом уровне. В диссертации отражены важные данные о

противомикробной активности фермента L-лизин- α -оксидазы и культуральной жидкости продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai и их влияния на условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы, показана перспективность использования фермента для борьбы с бактериальными инфекциями и биопленкообразованием. Разработана методика культивирования продуцента. Разработана методика получения фермента и экспресс тест-система для определения активности фермента.

Личное участие соискателя в получении результатов. Диссертантом выполнены микробиологические методы культивирования микроорганизмов и подготовка культуры к проведению исследований, описанных в диссертационной работе. Произведены исследования образования культурами микроорганизмов биопленок и их подавления культуральной жидкостью продуцента и гомогенным ферментом. Проведена генетическая идентификация микроорганизмов и математически – статистический анализ полученных данных. Совместно с ведущим научным сотрудником лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ д.м.н., В. Ф. Ларичевым и заслуженным профессором РУДН кафедры биохимии имени академика Т. Т. Берёзова Медицинского института, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» имени Патриса Лумумбы д.б.м., И. П. Смирновой разработан новый и безопасный метод определения активности фермента L – лизин – α – оксидазы. Совместно с Ассистенткой Кафедры общей патологии имени В. М. Коропова Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина к.б.н., А. Ю. Арсенюк проведено исследование изменения структуры биопленки микроорганизмов под воздействием фермента L – лизин – α – оксидазы и подготовлены микрофотографии электронной микроскопии. Совместно с профессором РУДН кафедры биохимии имени академика Т. Т. Берёзова Медицинского института, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования

«Российский университет дружбы народов» имени Патриса Лумумбы д.б.м., И. П. Смирновой проведены иммунологические и аллергологические исследования фермента.

Степень достоверности результатов исследований определяется представительностью и достоверностью анализируемых выборок, проведением экспериментальной части работы на сертифицированном оборудовании с применением системы внешних и внутренних контролей, использованием валидированного референсного материала; полученные данные согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации. В работе использованы современные методики сбора и обработки информации, полученные данные основаны на применении обоснованных представительных выборочных совокупностей.

Новизна результатов проведенных исследований. Предложена упрощенная схема фракционирования и выделения культуральной жидкости с искомым ферментом. Разработан и апробирован новый метод лабораторного выделения фракции культуральной жидкости, содержащей фермент L-лизин- α -оксидаза без примесей и без потери удельной активности фермента с использованием ультрафильтрационных ячеек.

Разработан новый экспресс метод для определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости грибов рода *Trichoderma*.

Изучены иммуногенные и алергогенные свойства фермента L-лизин- α -оксидазы на теплокровных животных в широком спектре проб, а также произведены сравнения данных свойств с уже зарегистрированными на рынке Российской Федерации ферментативными препаратами, применяемыми для лечения инфекционных заболеваний.

Была показана биологическая активности культуральной жидкости и гомогенного фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 продуцента L-лизин- α -оксидазы в отношении 70-и изолятов полирезистентных уропатогенных *E. coli* (УПКП) в значения 8 – 14

мм для культуральной жидкости, а для гомогенного фермента зона задержки роста составила 9 – 18 мм.

Установлено в ходе эксперимента, что L-лизин- α -оксидаза проявляет наибольшую активность в отношении грамположительных микроорганизмов, что связано с особенностями строения клеточной стенки и наличия в ней L-лизина, как связующего элемента пептидогликана – основного компонента клеточной стенки.

Установлено прямое дозозависимое ингибирование образование биопленок на начальных этапах формирования у исследуемых штаммов, как грамположительных микроорганизмов, так и грамотрицательных в числе которых полирезистентные уропатогенные клинические изоляты (УПКП). И также отмечено, что на сформированные пленки видимого эффекта ни культуральная жидкость, ни гомогенный фермент не оказывают.

Практическая значимость проведенных исследований. В ходе проведения диссертационного исследования было определено и исследовано антагонистическое действие фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 по отношению к широкой выборке микроорганизмов.

Показано, что действие фермента фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 более выражено, в отношении грамположительных бактерий *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. К грамотрицательным микроорганизмам таким как УПКП (уропатогенная полирезистентная *Escherichia coli* subsp.), *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

также определялась антагонистическая активность. Референс-штаммы: *Staphylococcus aureus* ATTC 6538; *Escherichia coli* ATCC 2582, *Candida albicans* ATCC 10231

В работе были исследованы 46 штаммов полирезистентных уропатогенных *Escherichia coli*, с выраженной резистентностью к трем и более антибактериальным препаратам. Уровень антибактериальной активности фермента к данным штаммам определялась на уровне умеренной резистентности (зона задержки роста 11 – 18 мм) не зависимо от индекса резистентности штамма.

Разработан и оптимизирован новый метод определения активности фермента L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 в культуральной жидкости продуцента. Был разработана новая хромогенная смесь включающая тетраметилбензидин, заменивший стандартный канцерогенный реагент – орто-дианизидингидрохлорид.

Результаты исследований внедрены ФГАОУ РУДН им. Патриса Лумумбы (акт внедрения от 26 сентября 2024 года) и ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России (акт внедрения от 3 октября 2024 года)

Ценность научных работ соискателя. В эпоху глобальной пандемии антибиотикорезистентности поиск альтернативных антимикробных субстанций является наиболее важным и актуальным решением при терапии инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами.

Основные материалы диссертации в полном объеме отражены 4 публикации, из них 4 – в рецензируемых изданиях Scopus, WoS, ВАК, РИНЦ – в других изданиях, 5 – в материалах конференций.

Публикации:

1. Senyagin, A. N. A Novel Express Method to Determine Activity of Antitumor Enzyme L-Lysine- α -Oxidase of *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 / A. N. Senyagin, A. F. Larichev, I. P. Smirnova, I. V. Podoprigora // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2020. — Vol. 169, № 1. — P. 119-121.

2. Smirnova, I. P. Characterization of L-Lysine- α -Oxidase, A New Antitumor and Antiviral Drug Substance Synthesized by *Trichoderma* / I. P. Smirnova, V. I. Kuznetsov, I. V. Podoprigora, T. I. Mansur, A. N. Senyagin, I. G. Bashkirova // International Journal of Life Science and Pharma Research. — 2022. — Vol.12, № SP23. — P. 15-20.

3. Senyagin, A. The Effects of L-Lysine- α -oxidase Enzyme and *Trichoderma harzianum* Rifai Culture Liquid on the Formation of Biofilms by Uropathogenic Multiresistant *E. coli* / A. Senyagin, N. Sachivkina, M. Das, V. Semenova, O. Kuznetsova, A. Ibragimova // Fermentation. — 2023. — Vol. 9, № 8. — P. 710.

4. Senyagin, A. The Influence of L-Lysine-Alpha-Oxidase on the Biofilm Formation of Opportunistic Microorganisms Associated with Inflammatory Diseases of the Urinary Tract / A. Senyagin, N. Sachivkina, M. Das, A. Arsenyuk, R. Mannapova, A. Mannapov, T. Kubatbelov, D. Svistunov, O. Petrkhina, A. Zharov, N. Zhabo // Pathogens. — 2024. — Vol. 13, № 3. — P. 252.

Основные результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на всероссийских и международных зарубежных научно-практических конференциях: FEBS Open Bio 2019 (2019 год), «Молекулярные Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» МобиХим – Фарма (2019 год); XXIII, XXVI, XXVII Кашкинские чтения (2020 - 2023 года), FEBS Open Bio 2021 (2021 год), «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии, биотехнологии и экспертизы сырья и продуктов животного происхождения» (2022 год), XVIII Международная (XXVII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (2023 год).

Научные положения и выводы, сформулированные Сенягиным А. Н., аргументированы, экспериментально подтверждены и логически вытекают из результатов проведенных исследований. По объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на

соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 - Микробиология.

Диссертация Сенягина Александра Николаевича "Исследование антагонистического действия L-лизин- α -оксидазы продуцента *Trichoderma Harzianum* Rifai на условно-патогенные и непатогенные микроорганизмы " рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.11 – Микробиология (медицинские науки).

Заключение принято на заседании кафедры микробиологии имени В. С. Киктенко медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет Дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Присутствовало на заседании 11 человек. Результаты голосования: «за» - 11 человек, «против» - 0 человек, «воздержалось» - 0 человек, протокол № 030017– 04/05 от «05» декабря 2024 г.

**Профессор кафедры
микробиологии им. В. С. Киктенко
медицинского института
ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы
д.б.н., профессор**

О. А. Гизингер

**Ученый секретарь ученого совета
медицинского института
ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы
к.фарм. наук, доцент**



Т. В. Максимова