

Отзыв

официального оппонента кандидата биологических наук

Генералова Сергея Вячеславовича

о диссертации Ремизова Евгения Кирилловича на тему «Разработка способа получения пептидов, выделенных из личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica* и изучение их биологических свойств», представленной на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.01.06. – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Актуальность темы. Приобретение микроорганизмами устойчивости к лекарственным средствам сужает возможности для лечения болезней, которые эти микроорганизмы вызывают. Данное явление наблюдается у широкого спектра микроорганизмов и происходит во всём мире. Указанное обстоятельство вызывает угрозу для здоровья людей и животных. Инфицирование резистентными микроорганизмами может вызвать длительное течение болезни, повышенную летальность, увеличение стоимости лечения и иные серьезные последствия. Эта проблема имеет отношение к самым разным областям человеческой деятельности: охране здоровья человека и животных, сельскому хозяйству, продовольственной безопасности, экономическому развитию и т.д.

Диссертационная работа Ремизова Е.К. посвящена исследованию антимикробных пептидов. Они представляют сравнительно новый класс веществ, проявляющих противомикробную активность, в том числе и по отношению к антибиотикорезистентным микроорганизмам. Технологии получения антимикробных пептидов являются перспективным инструментарием для решения указанной глобальной проблемы – резистентности микроорганизмов к лекарственным соединениям. По этой причине тема научных исследований настоящей диссертации является актуальной и представляет большой интерес для ветеринарии, сельского хозяйства, медицины, а также соответствует глобальному плану действий Всемирной Организации Здравоохранения по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций диссертации. Положения и выводы работы обоснованы полностью раскрытой целью научного исследования, выполненными задачами и выбранной методологией. Автором проанализирован достаточный объем источников литературы, результаты исследования получены при выполнении большого объема экспериментов и подвергнуты глубокому анализу с использованием статистических методов. Положения, выносимые на защиту, а также выводы логично связаны между собой единой целью исследования. Следует отметить высокий уровень апробации результатов настоящей диссертации, который подтверждается призовыми местами конференций и конкурсов различного уровня, в том числе международных и проводимых за рубежом.

Достоверность и новизна полученных результатов. Полученные в диссертации результаты являются новыми и достоверными. Автором впервые представлен оригинальный способ получения субстанции, содержащей антимикробные пептиды, состоящий из этапов многостадийного высаливания, хроматографического разделения и создания конечной композиции. Впервые представлены результаты по изучению антимикробной активности пептидов, полученных по представленной технологии, по отношению к микроорганизмам III-IV групп патогенности, в том числе антибиотикорезистентным штаммам. Также автором впервые получены сведения о локализации исследуемых антимикробных пептидов при их введении в организм животных. Немаловажно отметить, что новизна представленных результатов диссертации подтверждается патентом Российской Федерации № 2714128 «Композиция антимикробных пептидов, полученных из личинок *Musca domestica*, и способ ее получения».

Результаты, представленные в диссертации, получены на основе большого анализа данных, для их получения автор использовал стандартные методы из соответствующих методических указаний и общих фармакопейных статей. В связи с этим достоверность полученных результатов не вызывает никаких сомнений.

Теоретическая и практическая значимость. Диссертационное исследование, выполненное Ремизовым Е.К., безусловно, представляет теоретический и практический интерес для биотехнологии, как науки. Сведения о получении антимикробных пептидов, изучении антимикробных свойств, а также метаболизации в организме лабораторных мышей имеют большое значение для дальнейших исследований при разработке новых противомикробных лекарственных препаратов и их влиянию на макроорганизм.

Оценка содержания диссертации, её завершенность. Материалы диссертационного исследования изложены на 99 страницах печатного текста. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических предложений, списка использованных литературных источников и приложений. При написании работы использовано 165 литературных источников, в том числе 135 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 21 таблицей и 32 рисунками, отражающими основное содержание выполненных исследований.

В разделе «Введение» автором обоснована актуальность разработки композиций на основе антимикробных пептидов и изучения их свойств, определены цель, задачи исследования, положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» автор представляет сведения об основных свойствах антимикробных пептидов и их классификации в зависимости от строения и происхождения; приводит описание механизмов действия антимикробных пептидов; анализирует имеющиеся литературные данные об антибактериальной активности антибиотиков и антимикробных пептидов; дает общую оценку перспективы использования антимикробных пептидов для профилактики и лечения болезней сельскохозяйственных животных. Более того, в данной главе представлен анализ литературных источников о содержании и выращивании насекомых *Galleria mellonella* и *Musca domestica*, являющихся продуцентами антимикробных пептидов.

В главе «Собственные исследования» в разделе 2.1 представлена характеристика объектов исследования, в разделе 2.2 подробно изложены

методы исследований, которые адекватны задачам настоящей работы. Раздел 2.3 посвящен результатам исследований и их обсуждению. Подраздел 2.3.1 посвящен выделению пептидов, полученных из личинок *G. mellonella* и *M. domestica*. В подразделе 2.3.2 приведено описание разработки метода очистки полученных пептидов и исследованию основных физико-химических свойств. Указанный подраздел подробно проиллюстрирован результатами хроматографических исследований, которые дают представление о составе фракций, полученных в результате многократного высаливания биомассы личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica*. Подразделы 2.3.3, 2.3.4 и 2.3.5 посвящены исследованию антимикробной активности полученных пептидных фракций по методам, изложенным в методических указаниях МУК 4.2.1804-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» и ОФС 1.2.4.0010.15 «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар». Для проведения указанных экспериментов использованы культуры микроорганизмов III-IV групп патогенности, полученные из государственных коллекций. Таким образом, автор использовал стандартизованный подход проведения исследований, результаты которых не вызывают никаких сомнений. В указанных разделах диссертации Ремизов Е.К. отмечает ингибирующее действие очищенных пептидов, выделенных из биомассы личинок *G. mellonella* и *M. domestica*, на рост типичных штаммов видов *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*. Установлены значения эффективных концентраций исследуемых антимикробных пептидов в отношении указанных микроорганизмов. Большой интерес для исследования фармацевтических композиций, состоящих из антимикробных пептидов, представляет подраздел 2.3.6, посвященный изучению биотрансформации антимикробных пептидов в организме белых мышей. В указанном разделе представлены сведения о накоплении антимикробных пептидов в печени и селезенке при внутрибрюшинном либо внутримышечном введении, а также в костном мозге при внутримышечном введении. При этом автором отмечено отсутствие накопления антимикробных пептидов в кровяном русле и почках.

Представленные результаты подтверждены качественными цветными иллюстрациями микроскопии исследуемых органов.

Разделы «Заключение», «Выводы» и «Практические предложения» являются логическим завершением диссертационной работы. В разделе «Заключение» автор проводит аргументированный анализ полученных результатов, а также дает оценку возможности их использования в дальнейших исследованиях. Содержание раздела «Выводы» адекватно количеству и содержанию основных положений диссертации, выносимых на защиту. В разделе «Практические предложения» кратко изложен порядок получения антимикробных пептидов согласно методике, разработанной в рамках настоящего диссертационного исследования. В разделе «Список литературы» представлено описание 165 литературных источников, используемых в диссертации. Следует отметить, что около 60% используемых в диссертации источников литературы опубликованы в течение последних десяти лет, что подтверждает актуальность выбранной темы и интерес научного сообщества к аналогичным исследованиям. В разделе «Приложения» представлены патент и дипломы, полученные за призовые места на конкурсах научных работ.

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из них – 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК РФ, 1 патент и 5 в других изданиях, в том числе сборниках конференций и семинаров – 3. В публикациях содержится полный объем информации, касающейся темы диссертации.

В целом диссертация Ремизова Е.К. является законченным исследованием, представляет решение актуальных задач, объединенных общим подходом, обеспечивающим возможность конструирования новых противомикробных фармацевтических композиций.

Соответствие автореферата содержанию диссертации. Содержание автореферата полностью соответствует основному содержанию диссертации. Оформление автореферата и диссертации отвечают требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления» (М.: Стандартинформ. – 2012).

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Диссертация и автореферат имеют доступный, лаконичный стиль изложения, в достаточной степени проиллюстрированы таблицами и рисунками. К достоинствам диссертации следует отнести разработанный комплексный подход по получению антимикробных пептидов из биомассы *Galleria mellonella* и *Musca domestica*, а также исследования биотрансформации антимикробных пептидов в макроорганизме. Полученные решения, безусловно, могут быть использованы при конструировании новых фармацевтических композиций и разработки схем лечения инфекционных болезней с их применением.

При анализе диссертации существенных недостатков не выявлено, но имеются замечания и вопросы для дискуссии:

1. В обзоре литературы следовало бы подробнее охарактеризовать известные на сегодняшний день способы получения антимикробных пептидов, в том числе и из насекомых. В связи с этим возникает вопрос, чем обоснован выбор *Galleria mellonella* и *Musca domestica* в качестве продуцентов антимикробных пептидов?

2. Откуда были получены объекты исследования, *Galleria mellonella* и *Musca domestica*? Представляли ли используемые насекомые определенную линию, полученную в результате контролируемого скрещивания, обладали ли какими-либо специфическими генотипическими или фенотипическими характеристиками?

3. В главе «Собственные исследования» следовало бы подробнее изложить экспериментальное обоснование используемых параметров (концентрация соли, рН раствора, температура и т.п.) при выделении пептидов из личинок насекомых, дать оценку содержания антимикробных пептидов в зависимости от стадии развития насекомых или условий их выращивания, наглядно представить схему получения антимикробных пептидов.

4. Не совсем понятен принцип нумерации полученных фракций. В работе упоминается, что получено 46 фракций. Данное количество является общим или относится к каждому эксперименту по извлечению пептидов из

биомассы? Более того, понятие «фракция» используется и при описании хроматографического разделения, что затрудняет восприятие материала при чтении.

5. При описании результатов исследования и формулировке выводов следовало бы указать количественный выход конечного продукта из единицы биомассы насекомых.

6. Были ли изучены молекулярно-массовые характеристики пептидных фракций, полученных в результате хроматографической очистки? Насколько они соответствуют времени удерживания при хроматографии?

7. По какому принципу выбраны концентрации пептидов при изучении антимикробной активности?

8. Возникают ли изменения в морфологии микроорганизмов после воздействия на них антимикробными пептидами?

9. Проводились ли эксперименты по изучению противомикробного действия пептидов на животных? Проявляла ли субстанция, содержащая антимикробные пептиды, токсичные свойства в отношении животных или клеточных культур?

10. Возможно ли на основе имеющихся результатов дать рекомендации по составу предполагаемой фармацевтической субстанции на основе антимикробных пептидов, полученных из биомассы *Galleria mellonella* и *Musca domestica*? Возможно ли акцентировать преимущество какого-либо вида исследуемых насекомых как продуцента антимикробных пептидов?

11. В тексте диссертации присутствуют опечатки и некоторые стилистические неточности. Также в работе следовало бы добавить раздел с описанием используемых сокращений и условных обозначений.

Следует отметить, что вышеперечисленные замечания не снижают общую положительную оценку и научно-практическую значимость исследования.

Заключение. По актуальности избранной темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне диссертационное исследование Ремизова Евгения Кирилловича на тему

«Разработка способа получения пептидов, выделенных из личинок *Galleria mellonella* и *Musca domestica* и изучение их биологических свойств», соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемых к кандидатской диссертациям, а ее автор, Ремизов Евгений Кириллович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.01.06. – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

кандидат биологических наук

по специальности 03.00.23 – биотехнология,

ведущий научный сотрудник

лаборатории профилактических иммуноглобулинов

Федерального казенного учреждения здравоохранения

Российский научно-исследовательский

противочумный институт «Микроб»

Федеральной службы по надзору

в сфере защиты прав потребителей

и благополучия человека

(ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

Роспотребнадзора)

Генералов Сергей Вячеславович

Почтовый адрес организации: 410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46

Контактный телефон: +7 (8452) 51-54-46

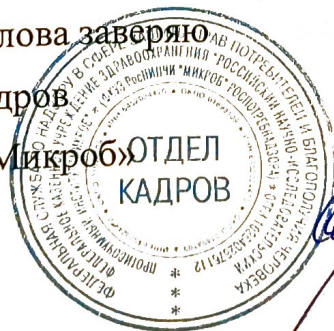
e-mail: rusrap1@microbe.ru; svgeneraloff@gmail.com

Подпись С.В. Генералова заверяю

Начальник отдела кадров

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» ОТДЕЛ

Роспотребнадзора



Шумигай О.В.

26.11.2020 г.