

**ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина**

проспект Науки, 5  
Московская область, г. Пущино  
142290  
Тел: +7 (495) 625-74-48  
Факс: +7 (495) 956-33-70  
Адрес в Интернете: <http://ibpm.ru/>  
e-mail: [boronin@ibpm.pushchino.ru](mailto:boronin@ibpm.pushchino.ru)



УТВЕРЖДАЮ

(Зам. директора ИБФМ РАН  
д.б.н., А.А. Леонтьевский)

11.11.2016г № 114-03.4-1

**ОТЗЫВ**

**Ведущей организации на диссертационную работу**

Легоцкого Сергея Александровича

«Получение, изучение свойств, стабилизация рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394 и разработка способа эффективного лизиса грамотрицательных бактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа С.А. Легоцкого посвящена получению штамма-продуцента рекомбинантного цитолитического фермента бактериофага S-394, изучению его физико-химических свойств, а также разработке методики получения стабильного препарата фермента и способа его применения для эффективного лизиса грамотрицательных бактерий.

**Актуальность темы диссертации.**

Ферменты, обладающие литическим действием по отношению к микроорганизмам, были впервые описаны в 20-е годы прошлого века, практически одновременно с открытием антибиотиков. Наряду с последними, литические ферменты рассматривались в качестве перспективных антимикробных агентов, но проиграли «конкурентную борьбу» антибиотикам по причинам недоступности технологий промышленного производства, а также отсутствия методик эффективного применения в медицинской практике.

В настоящее время интерес к литическим ферментам с точки зрения их возможного применения в медицине и ветеринарии вновь необычайно высок. Это обусловлено широким распространением патогенных микроорганизмов с множественной устойчивостью к современным антибиотикам. В тоже время, введение новых антибиотиков в медицинскую практику в последние годы сократилось до минимума, что является следствием исчерпания возможных метаболических путей воздействия на микроорганизмы, а также высокой себестоимостью подобных разработок. Проблема распространения бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, по мнению Всемирной Организации Здравоохранения, является одной из важнейших угроз глобальному здоровью и развитию человечества в целом. Она стоит настолько остро, что стала предметом отдельного саммита ВОЗ в Нью-Йорке в 2016 году. Необходимо отметить, что, в отличие от антибиотиков, возникновение резистентности к литическим ферментам у бактерий является крайне маловероятным событием, поскольку их мишенью является высоко консервативный компонент клеточной стенки - пептидогликан.

В свете вышесказанного не вызывает сомнения актуальность темы диссертационной работы Легоцкого С.А., а решение задач по получению стабильного препарата эндолизина бактериофага S-394 и подбору вспомогательных веществ для эффективного лизиса грамотрицательных бактерий необходимо для последующего применения этого фермента на практике.

### **Научная новизна.**

Научная новизна данной работы связана с изучением эндолизина недавно описанного бактериофага S-394 из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор». В ходе работы впервые был получен и охарактеризован рекомбинантный эндолизин Lys394, выявлены его физико-химические свойства и его специфичность по отношению к грамотрицательным бактериям.

В диссертационной работе проведено обширное исследование влияния различных вспомогательных агентов на проницаемость внешней мембраны *E. coli* с целью использовать их для доставки эндолизина из внеклеточного пространства к пептидогликану. Применение наиболее активных из таких агентов совместно с

эндолизин Lys394 позволило эффективно лизировать тестовую культуру *E. coli*, как в виде суспензии, так и в виде газонной культуры.

Для эндолизина Lys394 впервые был исследован механизм термоинактивации и подобраны условия, в которых фермент проявляет повышенную термостабильность.

### **Значимость результатов диссертации для науки и практики.**

Полученные автором данные указывают на новые возможности применения эндолизинов в качестве альтернативы антимикробным препаратам. Особо значимо, что на настоящий момент возникновения устойчивости к эндолизинам не выявлено. Использование стабильного препарата Lys394 для контроля грамотрицательной микрофлоры становится возможным благодаря подбору агентов, изменяющих проницаемость внешнего липидного бислоя. Так, использование пептида PGLa совместно с Lys394 оказывается эффективно как в случае лизиса взвешенных бактериальных клеток, так и в случае газонной культуры. По последним данным, токсичность антимикробных пептидов для клеток эукариот не коррелирует с их способностью разупорядочивать мембраны. Поэтому, несмотря на токсичность PGLa, в будущем возможно применение предложенного в данной работе подхода в медицинской практике с использованием менее токсичных аналогов PGLa.

### **О содержании диссертации.**

Диссертационная работа оформлена традиционным научном стиле, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертационная работа изложена на 151 странице печатного текста (139 страниц основного текста). Материал иллюстрирован 43 рисунками и 9 таблицами, которые в полной мере отражают теоретическую базу и основные результаты экспериментов. Библиографический указатель содержит 222 источника.

В обзоре литературы, соответственно теме исследования, в достаточной мере освещается современное состояние изучаемой проблемы. Автором проанализирована обширная отечественная и зарубежная литература, посвященная

пептидогликангидролазам бактериофагов, их классификации, субстратной специфичности и структурной организации. Сергей Александрович подробно остановился на описании структуры внешней мембраны *E. coli* и методах ее дестабилизации. В третьей части литературного обзора рассматриваются подходы к стабилизации ферментных препаратов. Аналитический обзор литературных данных свидетельствует о достаточной компетенции автора в вопросах, касающихся исследуемой проблемы, в необходимости и целесообразности проведения научного исследования по данной теме.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных экспериментальных подходов. Характер изложения предполагает возможность воспроизведения методов при постановке аналогичных экспериментов.

В разделе «Результаты экспериментов и их обсуждение» отражена большая работа, проделанная диссертантом и представляющая несомненный интерес. Данный раздел полностью отражает логику исследования и состоит из 4 подразделов. Первый подраздел посвящен биоинформатическому анализу аминокислотной последовательности эндолизина бактериофага S-394, клонированию кодирующего его гена в *E. coli*, оптимизации экспрессии и очистке эндолизина Lys394. В следующем разделе автор приводит результаты изучения физико-химических свойств полученного рекомбинантного белка, а именно определение оптимальных условий активности, анализ субъединичной организации фермента и спектра микроорганизмов, против которых он проявляет гидролитическую активность. Последние два раздела посвящены разработке подхода к использованию эндолизина Lys394 для лизиса грамотрицательных микроорганизмов на модели *E. coli* с использованием различных агентов для увеличения проницаемости наружной мембраны, а также анализу термостабильности и подбору компонентов для стабилизации фермента. Стоит отметить, что экспериментальная часть исследования построена таким образом, что каждый последующий раздел «опирается» на результаты предыдущего и является его логическим продолжением.

## Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов.

Цели и задачи исследования сформулированы четко и соответствуют названию и профилю диссертации. Достоверность результатов исследования подтверждается использованием как классических, так и самых современных биохимических, микробиологических и молекулярно-биологических методов, наряду с методами статистического анализа обработки данных. Научные положения и выводы в диссертационной работе Легоцкого С.А. корректно сформулированы, основаны на большом экспериментальном материале и строго вытекают из полученных результатов.

Резюмируя вышесказанное можно утверждать, что диссертационная работа С.А. Легоцкого является цельным, законченным исследованием и создает основу для применения на практике эндолизина бактериофага S-394 в виде отдельного препарата или в комбинации с другими литическими ферментами.

Результаты диссертационной работы представлены на международных конференциях и опубликованы в 11 печатных работах, среди которых 3 статьи – в журналах, рекомендованных ВАК, 2 патента РФ и 6 тезисов докладов на конференциях. Основные положения диссертации полностью отражены в автореферате.

Несмотря на вышесказанное, работа не лишена некоторых недостатков:

1. Подразделы литературного обзора, посвященные структуре пептидогликана и внешней оболочки грамотрицательных бактерий написаны избыточно подробно. В тоже время автор уделяет мало внимания сравнению эндолизинов фагового происхождения с литическими ферментами других организмов, например, бактерий, которые в настоящее время также активно исследуются с целью внедрения в медицинскую практику.

2. При обсуждении экспериментальной части работы, посвященной физико-химической характеристике эндолизина фага S-394 и его гидролитической активности, стоило бы сделать акцент на сравнительном анализе его свойств с уже охарактеризованными родственными ферментами, в частности с металлопептидазами бактериофагов, обладающими близким спектром хозяйской

специфичности. Например, сведение данных по свойствам ферментов в отдельную таблицу могло бы подчеркнуть преимущества или недостатки возможного практического применения эндолизина Lys394.

3. При описании методов получения генно-инженерных конструкций автор в некоторых случаях использует жаргонизмы, например, «рестрикция ДНК», «сайты рестрикции», «плазмиды были отсеквенированы».

Перечисленные замечания не умаляют высокий методический уровень работы и ее общую положительную оценку.


### **Заключение.**

Диссертационная работа Легоцкого Сергея Александровича «Получение, изучение свойств, стабилизация рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394 и разработка способа эффективного лизиса грамотрицательных бактерий», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия – и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), является законченной научно-квалификационной работой. По объему и методическому уровню исследований, научной новизне, практической значимости результатов, работа полностью соответствует требованиям пп. 9–14 Положения о присуждении ученых степеней (утверждено постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор С.А. Легоцкий заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия – и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Работа обсуждена на семинаре лаборатории энзимологии генетических процессов ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, протокол № 1/11 от 9 ноября 2016 г.

Заведующий лабораторией  
энзимологии генетических процессов,  
кандидат биологических наук



  
Грановского И.Э.  
М.А.И.С.

/Грановский И.Э./