

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.02
по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание
ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Гришина
Александра Владимировича «Влияние олигосахаридов и полисахаридов,
блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов
лизостафина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических
инфекций» на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Решение диссертационного совета от 9 декабря 2024 г. № 14 о присуждении Гришину Александру Владимировичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Гришина Александра Владимировича «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций» по специальности 1.5.11. «Микробиология» принята к защите 03 октября 2024 г. протокол № 8 диссертационным советом 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом №205 от 16 марта 2017 г., от 03.06.2021 №561/нк, с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 12 октября 2022 года № 1162/нк.

Соискатель Гришин Александр Владимирович, 1987 года рождения, гражданин РФ, в 2009 г. окончил ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева по специальности «Селекция и генетика сельскохозяйственных культур». В период 2009-2012 гг. проходил обучение в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет Биоинженерии и биоинформатики. С 2012 по 2017 гг. работал младшим научным сотрудником, с 2017 г. по настоящее время – научным сотрудником в лаборатории биологически активных наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ. Диссертационная работа Гришина Александра Владимировича «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций» выполнена в лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ.

Научный руководитель – Карягина-Жулина Анна Станиславовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ.

Официальные оппоненты: Потехина Наталья Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии микробов, кафедры микробиологии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и Плюта Владимир Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории функциональной энзимологии отдела молекулярной фармакологии и иммунологии Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатowski институт», дали положительные отзывы.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа Гришина А.В. является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальных научных задач – исследование природных полисахаридов и антибактериальных ферментов, влияющих на биопленки возбудителей оппортунистических инфекций, а полученные автором результаты имеют существенное значение для развития медицинской микробиологии и биоинженерии. Диссертационная работа Гришина А.В., представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, полностью удовлетворяет требованиям ВАК Минобрнауки России в соответствии с п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в действующей редакции), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. «Микробиология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии. Так, доктор биологических наук Потехина Наталья Викторовна известна своими работами в области микробных полисахаридов, кандидат биологических наук Плюта Владимир Александрович – своими работами в области исследования бактериальных биоплёнок, регуляции их формирования и воздействия различных веществ на этот процесс. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в цитируемых российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования, связанные с возбудителями оппортунистических инфекций и рекомбинантными белками, что подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. **Grishin A.**, Karyagina A.S., Tiganova I.G., Dobrynina O.Y., Bolshakova T.N., Boksha I.S., Alexeyeva N.V., Stepanova T.V, Lunin V.G., Chuchalin A.G., Ginzburg A.L. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by LecA-binding polysaccharides // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2013. – V. 42. – № 5. – P. 471–472.
2. **Гришин А.В.**, Кривоzubов М.С., Карягина А.С., Гинцбург А.Л. Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений // Acta Naturae. – 2015. – Т. 7. – № 2. – С. 43–56.
3. **Гришин А.В.**, Карягина А.С. Полисахарид галактан подавляет образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa*, но защищает сформированные биоплёнки от действия антибиотиков // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 5. – С. 668–681.
4. **Grishin A.V.**, Karyagina A.S., Vasina D.V., Vasina I.V., Gushchin V.A., Lunin V.G. Resistance to peptidoglycan-degrading enzymes // Critical Reviews in Microbiology. – 2020. – V. 46. – № 6. – P. 703-726.
5. Kudinova A., **Grishin A.**, Grunina T., Poponova M., Bulygina I., Gromova M., Choudhary R., Senatov F., Karyagina A. Antibacterial and anti-biofilm properties of diopside powder loaded with lysostaphin // Pathogens. – 2023. – V. 12. – № 2. 177.

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях: 1) The 2nd Conference on Natural Health (2nd CONAHE, Mostaganem University, Algeria, 2014); 2) XXII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2015, секция Биология, (Москва, 2015); 3) Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017 и 2019); 4) Объединённом научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Потехиной Н.В., (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

1) В автореферате нет списка сокращений.

2) В списке сокращений в диссертации многие сокращения даны только в английской транскрипции; в «Методах» не приведен состав среды М63, а состав среды LB приведен только после пятого упоминания в тексте; не объяснено понятие «панели» антибиотиков или «панели» коммерческих полисахаридов, «эффект инокулюма», таргетирование, стоковый раствор.

3) В работе есть опечатки и неточные выражения (например, маннопентаоза вместо маннопентоза), неточные выражения, например, методики культивации биоплёнок *P. aeruginosa* (лучше говорить методики культивирования); «основным компонентом

матрикса биоплёнок *S. aureus* считается полисахарид поли-β1-6-N-ацетилглюкозамин (PNAG, также называемый polysaccharide intercellular adhesin или PIA)». Это разные полисахариды.

4) В таблице 1 отсутствуют ссылки, а в таблице 2 – многие клетки – пустые.

5) Нет единообразия в терминологии димера «лизостафин/дисперсин В»: он обозначается и как слитный белок, и как химерный белок. Второй термин, на мой взгляд, более точный...

6) В работе использовали два штамма *P. aeruginosa* лабораторный и клинический изолят. При этом клинический изолят охарактеризован не был, также не была указана мотивация использования клинического изолята, а полученные результаты отдельно не обсуждались.

7) Почему для проверки способности подавлять образование биопленки галактаном были выбраны *Stenotrophomonas maltophilia* и *B. cenocepacia*. Содержат ли они лектин А?

8) Как можно объяснить тот факт, что обработка сформированных биоплёнок лабораторного штамма галактаном частично разрушает их, в то время как влияние галактана на сформированные биоплёнки изолята 216 практически не заметно.

9) Можно ли объяснить повышенную жизнеспособность клеток в биопленке *P. aeruginosa*, выращенную в присутствии галактана и амикацина, образованием галактановой «капсулы», окружающей и защищающей клетку от действия антибиотика?

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Плюты В.А., (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

1) Каков был выход рекомбинантных белков (лизостафина, дисперсина В и химерного белка Lst-DspB) в полученных бактериальных системах?

2) Известно ли что-либо автору о влиянии растительных олигосахаридов и/или полисахаридов на биоплёнки бактерий «полезных» для человека, например, об их влиянии на бактерии, стимулирующие рост растений, или на промышленные штаммы продуценты ферментов, витаминов и др. веществ?

3) Имеются некоторые замечания относительно наличия в диссертации и автореферате досадных опечаток и лишних фраз, что несколько диссонирует с хорошо выдержанным стилем изложения и оформления работы.

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) – отзыв положительный. Некоторые замечания и вопросы:

1) Для лучшего восприятия материала автору следовало разделить главу 3 «Результаты» на две части, разделив исследования, посвященные биопленкам *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

2) В п. 3.1 «Клонирование, наработка и выделение LecA» следовало более подробно описать процесс получения генно-инженерной конструкции и представить ее схему. В описании к рисункам 9 и 10 не приведены молекулярные массы полученных белковых продуктов.

3) Интерес вызывает получение химерного рекомбинантного белка, состоящего из

слитых последовательностей лизостафина и дисперсина В. Однако в работе не описана схема клонирования и не приведен иллюстративный материал, подтверждающий получение рекомбинантного белка.

На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:

1) Васина Д.В., к.б.н., заведующий лабораторией энзимологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ. Замечание: «В качестве замечания можно отметить несколько неаккуратное оформление автореферата: присутствуют следы правки текста и отдельные неточности. В частности, в первом выводе растительные олигосахариды вербаскоза, галактозил-маннотриоза и дигалактозил-маннопентаоза названы полисахаридами. Впрочем, очевидно, что это опечатка, поскольку в тексте автореферата и даже далее в том же первом выводе эти соединения вполне корректно описываются как олигосахариды».

2) Крупин П.Ю., к.б.н., заведующий лабораторией генетических технологий и молекулярного сопровождения селекции зерновых и зернобобовых культур ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии". Замечаний нет.

3. Алешкин А.В., д.б.н., профессор РАН, член-корр. РАН, заместитель директора по медицинской микробиологии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Замечания:

- I. В работе сказано, что бактериолитическая активность белка Lst-DspB была ниже, чем активность лизостафина. Автор связывает это с большим размером белка Lst-DspB. Значит ли это, что эта проблема будет общей для всех подобных слитных белков, и можно ли как-то избежать такого снижения бактериолитической активности?
- II. Было бы интересно узнать, оказывает ли галактан какое-либо влияние на биоплёнку золотистого стафилококка.
- III. Вторая часть работы выглядела бы более убедительно при наличии каких-либо данных об эффективности исследуемых белков *in vivo*.
- IV. В автореферате присутствует некоторое количество ошибок и опечаток, в частности, не везде названия видов бактерий выделены курсивом (например, на стр. 18).

4. Фурсов М.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора. Замечаний нет.

Все отзывы положительные.

Вопросы задавали: д.б.н. Николаев Ю.А., д.б.н. Плакунов В.К., д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Пименов Н.В., к.б.н. Журина М.В. (ФИЦ Биотехнологии РАН).

В дискуссии приняли участие: д.б.н. Николаев Ю.А., д.б.н. Плакунов В.К., Крупин В.Ю. (ВНИИСБ), д.б.н. Пименов Н.В.

Диссертационный совет отмечает, что диссертация Гришина А.В., посвященная изучению некоторых подходов к борьбе с биоплёнками оппортунистических патогенов, является завершённой научно-квалификационной работой.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в работе продемонстрированы новые, не описанные ранее эффекты, характеризующие воздействие полисахаридов на бактериальные биоплёнки. В частности, в работе показано, что полисахарид галактан может как ингибировать, так и стимулировать образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* в зависимости от использованной концентрации, что не наблюдалось ранее для других соединений, взаимодействующих с лектином LecA. Также продемонстрирована способность полисахарида галактана защищать бактерии внутри биоплёнки от некоторых антибиотиков, что не было описано ранее для полисахаридов, не являющихся компонентами матрикса биоплёнок. В совокупности эти эффекты демонстрируют неоднозначный характер взаимодействия галактана и биоплёнок *P. aeruginosa*. Кроме того, в работе выявлен олигосахарид (α -дигалактозилманнопентаоза), обладающий наибольшим сродством к лектину LecA *P. aeruginosa* по сравнению с другими описанными в литературе моно- и олигосахаридными лигандами LecA

Существенным достижением автора является получение химерного белка, состоящего из антимикробного литического фермента лизостафина, разрушающего бактериальные клетки, и гликозидгидролазы дисперсина В, разрушающего полимеры матрикса биоплёнки, и проявляющего бóльшую литическую активность в отношении биоплёнок *Staphylococcus aureus* по сравнению с каждым из указанных белков по отдельности или их смесью в эквивалентных концентрациях. Продемонстрирована возможность придания частицам минерала диоксида антибактериальных и антибиоплёночных свойств за счет адсорбции лизостафина на поверхности таких частиц.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что разработана новая модель для культивации биоплёнок *P. aeruginosa*, в которой биоплёнки культивируются на границе между воздухом и питательной средой (на пластиковых купонах, помещённых в лунки культиватора). Использование такого способа выращивания биоплёнок может быть использовано как для анализа морфологии биоплёнок с помощью микроскопии, так и для определения количества жизнеспособных клеток в биоплёнке.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что полученные результаты являются воспроизводимыми и достоверными, а выводы – обоснованными. При выполнении диссертационной работы был применён комплекс микробиологических, биотехнологических, аналитических подходов.

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, отражающих основные результаты работы, в том числе 5 статей в изданиях, индексируемых в Web of Science и/или Scopus, и 5 тезисов на научных конференциях. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

Личный вклад соискателя состоял в непосредственном участии на всех этапах работы, включая планирование и постановку экспериментов, обработку и анализ данных, апробацию основных положений работы на различных конференциях, подготовку публикаций по теме работы.

Заключение.

Диссертация **Гришина Александра Владимировича «Влияние олигосахаридов и полисахаридов, блокирующих функции лектина LecA, и рекомбинантных ферментов лизостафина и дисперсина В на биоплёнки возбудителей оппортунистических инфекций»** является законченной научно-квалификационной работой, внесшей вклад в изучение и разработку подходов к борьбе с биоплёнками оппортунистических патогенов.

Диссертационная работа Гришина А.В. соответствует п.15 «Структурированные сообщества микроорганизмов, в том числе биопленки» паспорта специальности 1.5.11. «Микробиология», отрасль науки – Биологические науки.

Работа соответствует профилю Диссертационного совета 24.1.233.02 и требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями и дополнениями в редакции № 62 от 25.01.2024).

На заседании 9 декабря 2024 г. Диссертационный совет 24.1.233.02 принял решение присудить Гришину Александру Владимировичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. «Микробиология».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 чел., из них 9 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 15, «против» – 0, недействительных бюллетеней – 1.

Председатель диссертационного
совета 24.1.233.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
доктор биологических наук

Ученый секретарь диссертационного
совета 24.1.233.02
ФИЦ Биотехнологии РАН,
доктор биологических наук



Н.В. Пименов

Т.В. Хижняк

9 декабря 2024 г.