

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Левашова Павла Андреевича
«Ферментативный лизис бактерий»
на соискание ученой степени доктора химических наук
по специальностям 03.01.04 – биохимия и
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Левашова П.А. посвящена важным и актуальным направлениям «на стыке» биохимии и бионанотехнологии, а именно - созданию комплексного «методического подхода для анализа действия бактериолитических ферментов на живые бактериальные клетки», исследованию процессов адсорбции-десорбции и влияния таких бактериолитических ферментов как лизоцим на устойчивость большого числа разнообразных бактериальных клеток при заданных условиях, сравнению лизоцима с другими бактериолитическими ферментами (в том числе, с ранее малоизученными), разработка методик модификации и иммобилизации таких ферментов для дальнейшего бионанотехнологического применения.

Диссертационная работа Левашова П.А. построена традиционным образом и состоит из следующих основных разделов: «ВВЕДЕНИЕ», «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ», «РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ», «ВЫВОДЫ», «СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ» (в котором цитируется 235 ссылок). Положительно то, что по материалам диссертационной работы опубликовано 19 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus. Особенно ценно наличие 4-х патентов, подтверждающих как новизну, так и практическую значимость работы. Положительно то, что основные результаты диссертационной работы были представлены автором на 29 международных конференциях, причем ряд тезисов докладов опубликован в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

2

Научная новизна и практическая значимость данной работы состоит в следующем. Автором показано, что при исследовании ферментативного лизиса бактериальных клеток можно применять единые количественные параметры, а для интерпретации данных - использовать предложенную им оригинальную математическую модель. Это полностью подтвердилось в данной работе независимыми экспериментами и результатами, полученными с помощью разных методов. В работе впервые проведено «сравнение бактериолитических свойств лизоцима по отношению к большому числу различных штаммов микроорганизмов». Большим достижением работы является то, что автором впервые обнаружена бактериолитическая активность серотрансферрина, интерлейкина-2 и компонента комплемента C2; их «субстратная специфичность в отношении живых бактериальных клеток». Автором проведено сравнение этих данных со свойствами лизоцима; показано, что «лизосим может активироваться в присутствии глицина и заряженных аминокислот, при этом эффект зависит от типа субстрата – вида бактериальных клеток»; проведена оценка активности лизоцима в присутствии различных поверхностно-активных веществ (ПАВ) и предложена математическая модель для выявления общих закономерностей в активности лизоцима в присутствии ПАВ.

В работе получены образцы ковалентно-иммобилизованного лизоцима (КИЛ) и показано, что КИЛ эффективно сорбирует «липополисахариды бактерий (эндотоксины)», т.е. КИЛ потенциально может использоваться в качестве сорбента для медицинских процедур.

Предложенная автором математическая модель даёт возможность «корректно интерпретировать данные турбидиметрического измерения бактериального лизиса», позволяет в экспресс-режиме детектировать «активность бактериолитических ферментов, исследовать кинетику ферментативного лизиса бактериальных клеток в реальном времени». Положительно то, что автор предлагает подходы к изучению неферментативных свойств лизоцима «как опсонина для более глубокого понимания его роли в работе иммунной системы, так как известно, что лизосим

121

эффективен не только в лечении бактериальных инфекций, но также и при лечении в ряде вирусных и онкологических заболеваний». Несмотря на то, что лизоцим из белка куриного яйца достаточно хорошо известен и активно используется, автор работы нашел целый ряд новых фактов и обогатил биохимию ферментов множеством важных данных.

Несомненно, что основные данные, представленные в данной работе, были получены лично автором или же при непосредственном участии автора; автор самостоятельно обработал и всесторонне проанализировал полученные в работе результаты и сделал обобщающие выводы.

Выводы работы полностью обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Автореферат диссертации Левашова П. А. «Ферментативный лизис бактерий» и опубликованные работы полностью отражают содержание диссертации.

Даже к такой хорошей работе как диссертация Левашова П.А. имеется ряд замечаний, которые связаны скорее с оформлением и представлением полученных данных, но не затрагивают существа проведенной работы:

1. Цели исследования поставлены слишком широко и описаны с использованием ряда тривиальных словосочетаний типа (стр. 12 диссертации и стр. 5 автореферата): «Целями работы было: ... корректной интерпретации экспериментальных данных, исследование на разные бактериальные клетки в различных условиях...», которые желательно было бы конкретизировать или можно было бы исключить. Это не является принципиальным замечанием, т.к. задачи исследования сформулированы четко и кратко.

2. В диссертации и автореферате можно было бы сделать короче название раздела №1 (стр. 10 автореферата) и №5.1 (стр. 75 диссертации): «Методические особенности измерения скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток. Выбор условий эксперимента для обеспечения ферментативной стадии расщепления клеток как скорость лимитирующей» и сократить описание части этого раздела в автореферате (оставив это описание только в диссертации). Например, сократить описание этого раздела в

4

автореферате на стр. 10 «Известно, что зависимость оптического поглощения суспензии нелинейно зависит от концентрации клеток.»; рассуждения на стр. 12-13 об избытке фермента в системе, «о неправильном выборе концентрации фермента» и т.п., что является хорошо известным. В диссертации и автореферате можно было бы сделать короче также название других разделов : особенно №5.4; №5.5 и №5.6 на стр. 108, 118 и 128 диссертации, что соответствует №4; №5 и №6 на стр. 26, 32 и 35 автореферата.

3. В целом, автореферат является излишне обширным, занимая 60 страниц. Это при том, что сама диссертация занимает в сумме 195 страниц (включая 125 страниц, объединяющих основные разделы «ВВЕДЕНИЕ», «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ», «РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ», «ВЫВОДЫ»). Помимо указанных в замечании 2 сокращений, на мой взгляд, излишним является и Рисунок 2-1. «Упрощённая типичная схема протекания ферментативного лизиса во времени» (стр. 85 диссертации и стр. 15 автореферата).

4. Недостаточно места уделено обсуждению результатов по каталитической активности серотрансферрина, что требуется, т.к. эти данные безусловно являются важными и новыми результатами работы. Поэтому возникают вопросы о механизме действия серотрансферрина в сравнении с лизоцимом (рис. 4-5 на стр. 117 диссертации и стр. 31 автореферата). Например, важным является вопрос к диссертанту о гипотезе, объясняющей достаточно высокую бактериолитическую активность серотрансферрина по отношению ко всем изученным бактериям, тогда как бактериолитическая активность лизоцима по отношению к *B. subtilis* и *B. megaterium* существенно отличается (судя по рис. 4-5, это отличие составляет не менее порядка величины). Обе эти последние бактерии относятся к роду «*Bacillus*» и являются грамположительными палочковидными бактериями (как и еще около 217 видов бактерий рода «*Bacillus*», обитающих главным образом в почвенном слое). Неужели у обеих бактерий целостность клеточной стенки должна нарушаться под действием серотрансферрина в равной степени, а в присутствии лизоцима –

5

практически только в случае *B. subtilis* ? Кроме того, автором не приведены данные к следующим утверждениям: А) «Наличие бактериолитической активности серотрансферрина также было нами подтверждено для коммерческих препаратов серотрансферрина лошади и генно-инженерного рекомбинантного серотрансферрина человека.»; Б) «Также нами было выяснено, что активность серотрансферрина максимальна в отсутствие ионов железа.». Это не обязательно приводить в автореферате, но требовалось бы описать подробно в диссертации, тем более, что раздел 5.4.3. «Серотрансферрин» занимает только 3 страницы текста (с.115-117) в диссертации.

5. Недостаточно места уделено обсуждению результатов по влиянию ПАВ на бактериолитическую активность лизоцима (раздел 5.7., который занимает только 5 страниц текста диссертации, с.137-141). Известно, что механизм действия на активность ферментов двух различных ПАВ: ионного додецилсульфата (ДСН) и неионного Твин-21, - принципиально отличается. Некорректно сводить этот эффект только к тому, что «...Твин-21 вероятно связывается на двух участках молекулы лизоцима с константами десорбции порядка $3 \cdot 10^{-8}$ и $3 \cdot 10^{-7}$ М, а ДСН, вероятно, на одном участке молекулы лизоцима с константой десорбции порядка $1.3 \cdot 10^{-4}$ М». Конечно, автор имеет право предлагать свое видение проблемы, но это требует детального обсуждения. Еще более наглядно этот недостаток проявляется в других системах лизоцим-ПАВ-бактерии, описание которых стоит только в следующем: «Нами также было изучено влияние других ПАВ на лизис бактерий под действием лизоцима. Картина изменений активности лизоцима в отношении грамположительных бактерий *M. luteus* в присутствии катионного ПАВ бромида додецилтриметиламмония и цвиттерионного ПАВ кокоамидопропил бетаина имеет также сложный характер, аналогичный моделированию на рис 7-2.» (с.141 диссертации). Этого явно недостаточно, т.е. описание и обсуждение важных данных, приведенных на рис 7-2, практически отсутствует.

6

Высказанные замечания не изменяют общего положительного впечатления от представленной диссертационной работы. Докторская диссертация Левашова Павла Андреевича «Ферментативный лизис бактерий», является завершенной научно-квалификационной работой, в которой (на основании выполненных автором исследований) разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение важной научной проблемы получения и интерпретации кинетических данных ферментативного лизиса 37 видов бактерий. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне; обладает несомненной актуальностью и научной новизной; имеет как фундаментальное, так и практическое значение.

Результаты работы соответствуют паспортам специальности 03.01.04 — «Биохимия» (химические науки) по областям исследования: п. 1 «Проблемы строения, свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов в биологических объектах, изучение молекулярной организации структурных компонентов, выяснение путей метаболизма и их взаимосвязей» и п. 4 «...проблемы биологического катализа..», а также п. 8 «Разработка научно-методических основ для применения стандартных биосистем на молекулярном, клеточном, тканевом и организменных уровнях в научных исследованиях, контроле качества и оценки безопасности использования пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмернокосметических биопрепаратов» паспорта специальности 03.01.06 - биотехнология. По актуальности, новизне, методическому уровню и практической значимости результатов, объему проведенных исследований, диссертационная работа полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора химических наук, и оформлена согласно Приложениям № 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова».

7

Автор работы, Левашов Павел Андреевич, безусловно заслуживает присуждения учёной степени доктора химических наук по специальностям: 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:
Доктор химических наук,
доктор биологических наук,
профессор по кафедре органической и биологической химии
ведущий научный сотрудник,
руководитель группы аналитической биохимии
ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Зайцев Сергей Юрьевич
«11» января 2021 г.

Контактные данные:

тел.: 7(964 [redacted]), e-mail: [redacted]

Специальности, по которым официальным оппонентом защищены диссертации: 03.00.04 – биохимия (д.б.н.);
02.00.10 – биоорганическая химия, 02.00.06 – высокомолекулярные соединения (д.х.н.).

Адрес места работы:

142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, дом 60.

отдел физиологии и биохимии с/х животных
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста),
Тел.: +7 (4967) 65-11-32; e-mail: kadry@vij.ru

Подпись сотрудника ФГБНУ ФИЦ ВИЖ и м. Л.К. Эрнста
С. Ю. Зайцева удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ ФИЦ ВИЖ и м. Л.К. Эрнста
Н. В. Сивкин

Начальник отдела кадров ФГБНУ ФИЦ ВИЖ и м. Л.К. Эрнста
А. М. Уражок

