ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Лазарева Василия Николаевича

на диссертационную работу Болосова Ильи Александровича по теме: «Изучение функциональной активности и совместного действия кателицидинов китопарнокопытных», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа посвящена изучению свойств и биологической активности кателицидинов – одного из ключевых семейств антимикробных пептидов (АМП), которые являются частью системы врождённого иммунитета позвоночных животных. Актуальность темы обусловлена стремительным распространением антибиотикорезистентных штаммов клинически значимых бактериальных патогенов, что создаёт острую потребность в поиске новых противомикробных соединений. Антимикробные пептиды, и, в частности, кателицидины, могут рассматриваются как перспективная основа для разработки противомикробных препаратов нового поколения, способных преодолевать существующие механизмы формирования резистентности. Особое внимание в работе уделено представителям отряда китопарнокопытных, для которых характерно высокое разнообразие одновременно экспрессирующихся кателицидинов, различающихся по структуре и основному механизму действия. Изучение синергических взаимодействий между этими соединениями представляет значительный интерес как с фундаментальной точки зрения, с целью расширения представлений о сформированных в ходе эволюции стратегиях врождённого иммунитета, так и с прикладной – для создания эффективных комбинированных терапевтических средств, обладающих низкой токсичностью и сниженным риском формирования резистентности. Таким образом, тема диссертации является актуальной, научно обоснованной и практически значимой.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Общий объём работы составляет 122 страницы машинописного текста, включая 24 рисунка и 8 таблиц. Список литературы содержит 234 источника, преимущественно представленных современными публикациями в высокорейтинговых международных журналах, что свидетельствует о глубокой проработке темы.

Во введении присутствуют четко сформулированные цели и задачи исследования, обоснование научной новизны, теоретической и практической значимости, а также положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из пяти разделов и охватывает широкий спектр вопросов, от общих сведений об АМП и их классификации до подробного описания представителей основных семейств, дефенсинов и кателицидинов, включая α-спиральные кателицидины, в том числе человеческий LL-37, β-шпилечные пептиды и пролин-богатые кателицидины. В рамках обзора подробно рассмотрены известные механизмы их биологического действия, включая иммуномодулирующие свойства и подробности их взаимодействия с основными мишенями, таким как бактериальная мембрана или рибосома. Отдельный раздел посвящён совместному действию АМП, что непосредственно связано с основной темой работы. Обзор написан подробно, с привлечением актуальных литературных данных и отражает понимание автором современного состояния области исследования.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает все использованные методические подходы, включая биоинформатический анализ, конструирование и сборку нуклеотидных последовательностей, получение штаммов-продуцентов, экспрессию и очистку исследуемых пептидов, определение антимикробной активности, исследование синергического действия, гемолитической и цитотоксической активности, проницаемости бактериальных мембран, ингибирования биосинтеза белка, изучение механизмов резистентности и оценку лечебной эффективности на мышиной модели. Методическая часть изложена подробно и позволяет воспроизвести эксперименты.

Основная часть работы – «Результаты и обсуждение» состоит из пяти разделов, логически соответствующих поставленным задачам. В данном разделе подробно описаны выбор объектов исследования, структурно-функциональное исследование пролин-богатого mini-ChBac7.5Nα, изучение структуры и антимикробной активности додекапептидов, изучение совместного действия кателицидинов козы *Capra hircus* и структурно-функциональное исследование протегрина. Каждый из разделов содержит собственные экспериментальные данные, их анализ и сопоставление с литературой.

Разделы Заключение и Выводы обобщают полученные в рамках работы результаты и формулируют пять основных выводов, соответствующих поставленным задачам.

Научная новизна и практическая значимость

Научная новизна работы не вызывает сомнений и заключается в изучении структурных особенностей исследуемых кателицидинов и механизмов их совместного действия. В рамках работы впервые получены и исследованы многочисленные модифицированные варианты исследуемых АМП. В рамках исследования пролин-богатых кателицидинов показана значимая роль С-концевого участка пептида в проникновении через бактериальную мембрану, а также получены варианты пептидов, проникающих в клетку независимо от транспортных белков SbmA. Впервые обнаружен уникальный β-шпилечный додекапептид кашалота, исследованы его биологические функции и структурная организация. Показано, что додекапептиды коз формируют антипараллельные β-структурные димеры. Главной особенностью работы является изучение синергического действия коэкспрессирующихся кателицидинов, в рамках которого впервые были описаны

механизмы взаимодействия данных пептидов и показано, что использование смеси пептидов препятствует формированию резистентности. Основными практическими результатами работы можно считать подтверждение перспективности использования коктейлей антимикробных пептидов для терапии инфекционных заболеваний, а таже разработку модифицированного варианта протегрина свиньи с повышенной селективностью в отношении бактериальных клеток, эффективность которого была подтверждена *in vivo* на мышиной модели.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием широкого спектра современных взаимодополняющих методов исследования. Методы исследования выбраны корректно и соответствуют поставленным задачам. Эксперименты проводились с использованием корректных контролей и с применением статистической обработки данных. Полученные данные в полной мере изложены на рисунках и графиках. Полученные результаты согласуются с литературными данными и не противоречат им. Выводы логически вытекают из экспериментальных данных и полностью соответствуют поставленным задачам. Обоснованность и достоверность полученных выводов подтверждается апробацией работы на международных конференциях и публикацией основных результатов работы в 7 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, включая 4 публикации в журналах первого квартиля, а также получены 3 патента РФ, что подтверждает высокий уровень и практическую значимость выполненных исследований.

Вопросы и замечания

1. Почему в качестве метода получения пептидов был выбран биотехнологический, а не химический синтез? Вопрос не касается пептидов, полученых для структурных исследований.
2. Поскольку исследуемые пептиды были получены с использованием рекомбинантной технологии, добавление в текст (возможно, в качестве приложения) аналитических характеристик (хроматограммы, данные о чистоте, наличии липополисахаридов) усилило бы диссертационную работу.
3. Были ли клонированы полученные резистентные штаммы *E.coli* или работа велась с пулом клеток? Есть ли в дальнейших планах провести полногеномное секвенирование этих штаммов, чтобы исключить иные механизмы возникновения резистентности?
4. Стр.83 Автор пишет, что добавление 0.1% бычьего сывороточного альбумина предотвращает неспецифическую сорбцию АМП и повышает их биодоступность. Тем не мнее, известен факт, что БСА способен к сорбции на своей поверхности пептидов, в том числе и антимикробных. Проводился ли контроль влияния БСА на связывание пептидов и не вносит ли он вклад в наблюдаемые синергические эффекты?

Заключение

Диссертационная работа Болосова Ильи Александровича представляет собой завершённое научное исследование, выполненное на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Диссертационная работа соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, доцент, заместитель генерального директора по научной работе, заведующий лабораторией генной инженерии отдела клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России)

Лазарев Василий Николаевич

Контактные данные:
Тел.: +7(916)635-24-55 , e-mail: lazarev@rcpcm.org
Адрес места работы:
119435, Россия, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1

Данные Лазарева В.Н. подтверждаю
Ученый секретарь
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России
кандидат биологических наук /Е.С.Кострюкова/

Дата: «20» октября 2026 г.