

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию **Назарова Антона Сергеевича**  
**«Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов  
ультравысокопроизводительного скрининга»**,  
представленную на соискание ученой степени кандидата  
химических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология.

Диссертационная работа А.С. Назарова, представленная на защиту, посвящена поиску новых соединений, обладающих антибактериальной активностью с помощью ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы.

Идентификация новых веществ, обладающих противомикробной активностью, является в настоящее время чрезвычайно актуальной задачей. Актуальность и важность проблемы определяется высокой скоростью роста штаммов патогенных бактерий, обладающих резистентностью к наиболее часто используемым антибактериальным препаратам. В данной работе был использован ультравысокопроизводительный микрофлюидный скрининг для исследования микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris*. В результате исследования был обнаружен штамм *Bacillus pumilus* 124, который проявлял наибольшую антимикробную активность по отношению к *S. aureus* за счет синтеза антибиотика амикумацина (Ami). Также была разработана платформа, которая позволила детализировать спектр активности Ami для отдельных клеток микробиоты.

С помощью биоинформатических методов анализа генома автором был идентифицирован кластер генов биосинтеза Ami, а также определены ранее не охарактеризованные ферменты AmiN и AmiO, которые участвуют в метаболизме амикумацина. А.С. Назаровым было показано, что киназа AmiN инактивирует Ami в результате его фосфорилирования, а фосфатаза AmiO участвует в последующей реактивации Ami. Для киназы AmiN было также проведено биохимическое исследование, а также изучение структуры и основных свойств этого фермента. Основываясь на данных о гомологии А.С. Назаровым было открыто новое подсемейство AmiN-подобных киназ суперсемейства аминокликозид фосфотрансфераз (APH).

Представленную диссертационную работу можно отнести к перспективным направлениям научного и технологического поиска. Проведенное исследование имеет очевидную научную новизну, фундаментальную и практическую значимость.

Исследование имеет обоснованный экспериментальный план, разделенный на логичные этапы, необходимые для достижения конечного результата. В исследовании были использованы разнообразные современные научные методы – работа с микрофлюидной платформой, генетическая инженерия, методы работы с клетками различных культур, методы очистки белков, определение физико-химических характеристик белковых молекул, методы структурного анализа. Совокупность полученных экспериментальных результатов позволяет оценить работу А.С. Назарова как законченный научный труд с обоснованными выводами.

Диссертационная работа А.С. Назарова построена по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, результаты исследований и их обсуждение, выводы и список использованных литературных источников (102 ссылки). Материал диссертации изложен на 116 страницах текста и иллюстрирован 3 таблицами и 40 рисунками.

В разделе Введение автор показывает обоснование важности темы исследований, а также формулирует основные задачи своего исследования.

В разделе Обзор литературы описана история открытия антибиотиков и антибактериальных препаратов, а также различные платформы для открытия и идентификации классов этих веществ. Особое внимание автором уделено микрофлюидной платформе отбора антибиотиков, которая используется в данном исследовании. Обзор литературы написан хорошим научным языком, с применением научных источников последних лет. Также следует отметить, что Обзор литературы хорошо структурирован, имеет все необходимые таблицы и иллюстрации для того чтобы у читателя могло сложиться полноценное общее представление о состоянии мирового задела в области исследования.

Описание методик, использованных диссертантом, приведено в разделе «Материалы и методы». В данном разделе описаны методы работы с нуклеиновыми кислотами, различными культурами клеток, белками. Достаточно подробно описана

работа с микрофлюидной платформой, а также методы работы с белковыми структурами. Методики написаны хорошим научным языком, а их подробное изложение не оставляет сомнений, что их возможно воспроизвести другими исследователями.

Раздел Результаты и их обсуждение состоит из нескольких частей, соответствующих структуре работы. Основные результаты, полученные А.С. Назаровым – это идентификация штамма *Bacillus pumilus* 124, продуцирующего антибиотик амикумацин с помощью микрофлюидной платформы; выявлен кластер генов, кодирующих ферменты, осуществляющие метаболизм амикумацина; исследованы свойства новой киназы и фосфатазы; открыто новое подсемейство AmiN-подобных киназ, а также проведено исследование структуры и механизма действия киназы AmiN. Представленные в диссертации данные хорошо структурированы и снабжены необходимыми иллюстрациями. Все результаты полностью обоснованы и достоверны.

Пять выводов работы соответствуют поставленным в начале работы задачам, вполне отражают содержание работы, и позволяют считать основную цель работы вполне достигнутой.

По теме диссертации автором опубликованы 3 статьи (в соавторстве) в рецензируемых международных журналах, индексируемых в Web of Science. Апробация работы проведена в виде 5 устных и стендовых сообщений на международных и российских научных конференциях. Также по материалам работы получен 1 патент. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы А. С. Назарова «Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов ультравысокопроизводительного скрининга» полностью отражают содержание диссертации.

По результатам изучения текста диссертации можно высказать ряд вопросов и замечаний.

В обзоре литературы много внимания уделено платформам для поиска соединений, обладающих антимикробной активностью, а также классам таких соединений. При этом практически нет информации об антибиотике амикумацине, которому посвящена значительная часть экспериментальной работе, хотя это соединение было известно еще с 80-х годов прошлого столетия.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор предлагает использовать амикумацин для микробиологических и биохимических исследований (с. 62). При этом автор не уделяет должного внимания стабильности этого соединения, хотя этот параметр является важным для применения в такого рода исследованиях.

Из основного текста работы, а также аннотации и выводов следует, что Ami проявляет активность в отношении золотистого стафилококка. При этом, на рисунках 12 и 13 нет *Staphylococcus aureus*, в то время как на рисунке 14 работы *S.aureus* присутствует среди штаммов, МИК к которым составляет менее 1 мкг/мл. Хотелось бы понять, какой именно эксперимент в данной работе доказывает наличие антибиотической активности Ami по отношению к репортерной патогенной бактерии *S. aureus*?

В разделе 3.6 описывается «аланиновый скрининг» киназы AmiN и указаны номера остатков, подверженных мутагенезу. Автором установлено, что при замене некоторых остатков наблюдается полная потеря активности. А для других аминокислотных остатков такой эффект не наблюдается. Для упрощения восприятия результатов было бы хорошо представить эти данные в виде таблицы.

В качестве замечания следует отметить, что работа содержит многочисленные опечатки, а также некоторое количество ошибок в написании слов и пунктуации. Высказанные замечания, однако, не носят принципиального характера и не умаляют достоинств работы.

### **Заключение**

Диссертационное исследование Назарова Антона Сергеевича «Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов ультравысокопроизводительного скрининга», выполненное под руководством к.х.н., Терехова Станислава Сергеевича, является законченной научно-квалификационной работой.

По своей новизне, актуальности и достоверности работа Назарова Антона Сергеевича полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям согласно «Положению о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от

