

«Утверждаю»
Директор ФБУН МНИИЭМ
заслуженный деятель науки РФ,
д.б.н., профессор


В.А. Алешкин
«04» 12 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» (ФБУН МНИИЭМ) Роспотребнадзора на диссертационную работу Льва Игоря Олеговича
«Поиск новых бактериальных штаммов-антагонистов возбудителей кандидозов с целью разработки антимикотических препаратов»
по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии);
03.02.03-микробиология

Актуальность темы выполненной работы.

Современная биотехнология уделяет большое внимание созданию новых биопрепаратов медицинского назначения, направленных на лечение микозов, поскольку рост распространенности микотических инфекций во всем мире представляет собой серьезную проблему. Диссертационная работа содержит большой объем фактического материала по поиску новых активных штаммов продуцентов антимикотических соединений и созданию безопасных биопрепаратов на их основе. Представленное исследование направлено прежде всего на решение такой острой проблемы, как возрастание устойчивости патогенных грибов к применяемым в настоящее время антимикробным препаратам. Также большую проблему представляют собой побочные эффекты применяемых в настоящее время антимикотических препаратов – гепато-, миело- и нефротоксичность, желудочно-кишечные расстройства и даже кровотечения и т.д. Актуальность исследования несомненна, поскольку обусловлена необходимостью расширения поиска штаммов-продуцентов антимикробных веществ для разработки новых высокоэффективных и безопасных препаратов для борьбы с возбудителями грибных заболеваний человека, животных и растений.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в открытой печати, апробированы на конференциях.

Цель работы исходит из актуальности проблемы поиска новых штаммов-антагонистов наиболее распространенных возбудителей дерматомикозов, изучения их биологических свойств и природы антагонистической активности, а также разработки на их основе антимикотических биопрепаратов. Задачи исследования соответствуют его цели и включают отбор эффективного бактериального штамма-антагониста грибных патогенов, в том числе дерматомицетов рода *Candida*, изучение его культурально-морфологических и биохимических свойств, таксономической принадлежности, проверку на безопасность для теплокровных, подбор параметров культивирования и условий выделения и очистки антимикотических метаболитов, изучение их состава и свойств, разработку препаратов на основе живой культуры и метаболитов и испытание их активности.

Научная и практическая значимость работы.

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Отобран новый бактериальный штамм, проявляющий высокую активность в отношении грибных патогенов человека и животных. Впервые показано, что культура *Bacillus mojavensis* синтезирует антимикробные вещества класса аминогликозидов. Впервые обнаружена продукция бактериями рода *Bacillus* аминогликозида с молекулярной массой свыше 600 Да. Показана эффективность использования препарата на основе антимикотического вещества штамма *B. mojavensis* для

лечения кандидоза ротовой полости у мышей. Доказана эффективность использования антагонистических свойств *B. mojavensis* в отношении фитопатогенных грибов, в том числе возбудителя снежной плесени *Microdochium nivale*.

Практическая значимость работы определяется тем, что отобранный активный штамм *B. mojavensis* Lhv-97 с антимикробными свойствами депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов «ГКПМ - Оболенск». Подана заявка о выдаче патента на штамм *B. mojavensis*. Оптимизирован биосинтез антимикотических соединений выбранным штаммом-продуцентом. Разработан способ выделения и очистки антимикотических метаболитов, позволяющий получить препарат со степенью очистки не менее 95 %. Разработан Лабораторный регламент на получение антимикотического комплекса АМВ-97, выделяемого из культуральной жидкости штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Показана возможность использования прототипа препарата на основе АМВ-97 против кандидоза ротовой полости. Продуцент использован также в разработке прототипа препарата на основе живой культуры против фитопатогенов. Результаты независимых полевых испытаний на пшенице в 2013 г. на базе Рязанского НИИСХ и в 2015 г. на базе РГАТУ им. П.А. Костычева экспериментальных образцов биопрепарата на основе клеток штамма Lhv-97 в качестве альтернативы применению химических фунгицидов оформлены актами производственных испытаний, утвержденными руководителями указанных организаций.

Достоверность и апробация научных положений, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертационная работа выполнена на сертифицированном оборудовании с использованием современных методов исследования. Достоверность научных положений и обоснованность выводов обеспечены методологически и методически правильным соотношением цели, задач исследования и путей их реализации, достаточным объемом исследованного материала, а также комплексным алгоритмом исследований, адекватно использованными статистическими методами обработки результатов, логичной их интерпретацией. При обсуждении полученных результатов соискатель, опираясь на проанализированные литературные источники, дает логичное объяснение результатов исследования. В целом, работа характеризуется высоким методическим уровнем получения и обработки данных, а также анализа полученных результатов, что подтверждает обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

О достоверности полученных результатов также свидетельствуют приведенные сведения об их апробации и внедрении, обсуждение основных результатов на пяти российских и международных научных конференциях, так же в 14 печатных работах, включая 6 статей в реферируемых научных журналах (в том числе 2 в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени), 1 патента Российской Федерации на изобретение и 1 поданной заявки на патент Российской Федерации.

Значимость полученных соискателем результатов для развития соответствующей отрасли науки (Биотехнология (в том числе бионанотехнологии); Микробиология) заключается в том, что автором обоснована необходимость и показана перспективность разработки антигрибковых препаратов нового поколения. Впервые получен оригинальный штамм *Bacillus mojavensis* Lhv-97 способного подавлять широкий спектр грибных и бактериальных возбудителей болезней человека, животных и растений за счёт синтеза антимикробного компонента класса аминогликозидов с молекулярной массой свыше 600 Да. Обоснована перспективность применения препарата на основе антимикотического метаболита при лечении кандидозов у животных, а препарат на основе живой культуры *Bacillus mojavensis* Lhv-97 может обеспечить повышение урожайности растительных культур в полевых условиях, а также защиту от фитопатогенов, в том числе от возбудителей снежной плесени.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Результаты, полученные в диссертационной работе могут быть использованы в научно-исследовательских организациях биотехнологического и микробиологического профиля, в учреждениях ветеринарного, аграрного и медицинского профилей, занимающихся вопросами разработки и изучения новых иммунобиологических бактериальных препаратов антимикотической направленности.

Личный вклад соискателя. Автору принадлежит ведущая роль в моделировании и реализации исследования. Аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по проблеме, а также все этапы экспериментальной работы (планирование, проведение исследований, обработка результатов и их интерпретация), включая: выделение активного штамма, исследование его основных свойств, таксономической принадлежности, подбор питательных сред и условий культивирования продуцента, изготовление на его основе экспериментальных образцов биопрепаратов, выделение и очистка антимикотического вещества, проведены самим соискателем или при его непосредственном участии.

Оценка содержания и оформления диссертации.

Диссертация изложена на 161 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, списка опубликованных работ по теме диссертации (14) и приложений. Список литературы включает 149 наименований, в том числе 72 источника на иностранных языках. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 40 рисунками.

Во введении обоснованы актуальность и степень изученности темы исследования; также цель и задачи диссертационной работы, новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сведения об их апробации и внедрении, личном вкладе автора. Сформулированные автором цель и задачи исследования соответствуют актуальности проблемы расширения ассортимента активных и безопасных препаратов для лечения микозов.

В обзоре литературы представил подробный анализ современных достижений отечественной и зарубежной науки в области создания и разработки антигрибных препаратов, использующихся как для лечения микозов человека и животных, так и позволяющих снижать вредоносность возбудителей грибных болезней зерновых культур. В обзоре литературы приведена общая характеристика микозов человека и животных, а также достоинства и недостатки имеющихся препаратов для их лечения. Отдельный раздел обзора посвящен оценке опасности заражения зерна токсигенными фузариевыми грибами и обоснованию перспективности использования микробиологических препаратов для борьбы с фузариозами. Также в обзоре приведены данные по использованию антимикотических препаратов в пищевой индустрии. Значительный раздел обзора посвящен бактериям рода *Bacillus*, проблемам их классификации и перспективности использования их в качестве продуцентов антибиотических и, в том числе, антимикотических веществ.

Методологические подходы автора, применённые в работе полностью соответствуют поставленным задачам исследования. Работа охватывает широкий аспект исследований - от отбора перспективного штамма, обладающего высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным грибам, и изучения его свойств до испытаний прототипов препаратов на основе живой культуры штамма, а также его метаболитов против кандидоза на животных и против фузариозов на пшенице.

В экспериментальной части представлены результаты скрининга микроорганизмов, ранее выделенных из различных экологических ниш, на антагонистическую активность по отношению к грибным патогенам человека, животных и растений. Проведенные исследования позволили отобрать штамм, проявляющий активность к широкому спектру грибных и бактериальных патогенов, и наиболее активный против возбудителей кандидозов. Впервые изученные культурально-морфологические и биохимические свойства, а также

исследования с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF Biotyper и генетический анализ участка гена 16S рРНК позволили определить отобранный штамм как *B. mojavensis*.

Большое научное значение имеют результаты исследований, направленные на выделение, очистку и определение состава антимикотического метаболита штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Для выделения и очистки использовались обращенно-фазовая жидкостная хроматография низкого и высокого давления, а также эксклюзионная хроматография, что дало возможность получить образец действующего вещества с чистотой не менее 95 %. Для определения состава и структуры активного антимикотического вещества (АМВ) использовалась масс-спектрометрия и газовая хроматография. Проведенные исследования позволили точно установить молекулярную массу АМВ (678,51 Да) и частично определить его состав и структуру. Впервые установлено, что культура *B. mojavensis* синтезирует антимикотическое вещество класса аминогликозидов, и что бактерии рода *Bacillus* способны синтезировать аминогликозиды с молекулярной массой выше 600 Да.

С использованием клинических изолятов *C. albicans* в качестве тест-штаммов проведено сравнение активности очищенного АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 с флуконазолом - одним из наиболее эффективных препаратов для лечения кандидозов. Показано, что клинические изоляты *C. albicans* в большинстве случаев были устойчивы к флуконазолу в концентрации 10 мг/мл, однако были чувствительны к АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл. Также было показано, что применяемые в медицине аминогликозиды (амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин) не действовали на тест-культуру *C. albicans* в концентрациях 1-5 мг/мл, в то время как АМВ штамма Lhv-97 в концентрации 1 мг/мл давало зону подавления до 8 мм.

В экспериментальной части также представлены результаты подбора эффективных параметров культивирования штамма *B. mojavensis* Lhv-97, предложена схема получения экспериментальных образцов препаратов как на основе живой культуры для защиты растений от грибных фитопатогенов, так и на основе очищенных метаболитов для использования в медицине и ветеринарии. Разработан Лабораторный регламент ЛР 78095326-188-2017 на получение антимикотического комплекса АМВ-97.

Предложенная технология получения прототипов препаратов на основе метаболитов штамма Lhv-97 была использована также для получения инкапсулированных форм – полисахаридных гранул (с применением альгината натрия и хитозана) и липосомальных препаратов против микозов в медицине и ветеринарии. Их эффективность показана *in vitro* с использованием тест-культуры *C. albicans*. Результаты выполненных исследований позволили автору выбрать методические подходы к созданию эффективных способов инкапсулирования АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 как доступных моделей при разработке систем контролируемой доставки перспективных лекарственных средств.

Эффективность действия препарата в виде водного раствора АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 продемонстрирована *in vivo* на модели кандидозной инфекции полости рта у мышей.

В заключении автором обобщены полученные результаты. Диссертант сопоставляет результаты собственных исследований с данными литературы и предлагает собственную интерпретацию полученных данных, механизмы антигрибкового действия бактериальных антигрибковых иммунобиологических препаратов.

В Приложениях к диссертации представлены акты деляночных полевых испытаний приготовленных экспериментальных образцов препарата на основе высушенных клеток штамма *B. mojavensis* Lhv-97. Испытания были проведены в 2013 г. на базе Рязанского НИИ СХ и в 2015 г. на базе РГАТУ им. П.А. Костычева. Экспериментальные сухие образцы показали высокую эффективность: на яровой мягкой пшенице в отсутствие проявлений инфекций достоверная прибавка урожая относительно контроля при использовании препарата на основе штамма Lhv-97 составила 14,9% (на уровне действия химического препарата Виал ТТ). На озимой мягкой пшенице при искусственном инфицировании возбудителями снежной плесени при использовании экспериментального препарата на

основе штамма Lhv-97 урожайность более чем в 2,5 раза достоверно превысила урожай в инфицированном контроле и более чем в 1,5 раза при использовании химического протравителя Максим экстрим.

Таким образом, на основании результатов проведенных испытаний автором убедительно показано, что штамм *B. mojavensis* Lhv-97 может быть рекомендован для создания на его основе биопрепаратов для лечения кандидозов человека и животных. Также, препарат на основе живой культуры Lhv-97 может использоваться в сельском хозяйстве для борьбы с грибными фитопатогенами.

Выводы логически вытекают из результатов собственных исследований, являются достаточно аргументированными и обоснованными. В целом, диссертацию отличает ясность и четкость мышления, аргументированность, свободное владение литературным языком. Автореферат соответствует положениям диссертации.

По данной работе необходимо сделать следующие замечания:

1. Полученный материал позволяет говорить о первичной идентификации выделенного антимикробного вещества, то есть отнесения его к группе соединений (аминогликозидов). Данная работа смотрелась более выигрышной при полном определении структуры антимикотического вещества штамма *B. mojavensis* Lhv-97.
2. Штамм *B. mojavensis* Lhv-97 по своим свойствам описывается, как термотолерантный, со способностью хорошо расти при температурах до 55-60 °С. В то же время, никак не обсуждается факт (гл. 3.3.2), что оптимум синтеза антимикробных метаболитов наблюдается в пониженной области температур около 35 °С.
3. В диссертации (гл. 3.8) показано успешное лечение кандидоза ротовой полости с использованием АМВ в опытах на мышах. В то же время, испытания на животных предлагаемых образцов биопрепаратов на основе АМВ штамма *B. mojavensis* Lhv-97 в виде гранул и липосом – не приведены, что несколько обедняет работу.
4. Широта спектра антигрибной и антибактериальной активности штамма Lhv-97 (гл. 3.1.2), его безвредность, высокая активность против фитопатогенов – показывают, что интерес может представлять не только высокоочищенные антимикробные вещества, выделяемые достаточно сложным путем, но и непосредственно живая культура продуцента. Так, излишне лаконично обсуждаются, очень перспективные результаты (гл. 3.7.1) борьбы с грибными патогенами растений в полевых условиях при принудительном заражении. Кроме того, необходимо отметить, что *B. mojavensis* генетически близка к культуре *B. subtilis*, для которой известно несколько зарекомендовавших себя пробиотических препаратов на основе живых культур. И перспективность пробиотического использования штамма *B. mojavensis* Lhv-97, к сожалению, не рассмотрена.
5. Поскольку в диссертации приводятся данные о безвредности культуры для теплокровных животных, целесообразно привести данные об уровне ее фитотоксичности, коль скоро проводились испытания на растениях.
6. В тексте встречаются отдельные ошибки в орфографии и пунктуации, погрешности в стилистике и терминологии (антимикотики и пр).

Высказанные замечания не снижают общего положительного впечатления от работы. Они не затрагивают основных положений и выводов и носят, в основном, рекомендательный характер. Работа отличается новизной и актуальностью. Основные положения диссертации имеют большое значение для создания новых эффективных и безопасных препаратов против грибных болезней человека, животных и растений. Работа написана хорошим литературным языком, автор подробно проанализировал собственные результаты и обсудил их, сопоставляя с литературными источниками.

Заключение.

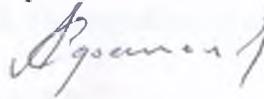
Таким образом, диссертация Льва Игоря Олеговича «Поиск новых бактериальных штаммов-антагонистов возбудителей кандидозов с целью разработки антимикотических препаратов» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по созданию новых бактериальных

иммунобиологических препаратов с выраженной антагонистической активностью к кандидозам и грибам, имеющих существенное значение для теоретической и прикладной микробиологии и биотехнологии. Соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии); 03.02.03- микробиология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании Ученого совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора 30 ноября 2017 г. протокол № 7.

Зам. директора ФБУН

«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор



С.С. Афанасьев

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
г. Москва, Северный административный округ,
125212, улица адмирала Макарова, д.10.
Телефон: +7 (495) 452-1816
Факс (495) 452-1830
Email: info@gabrich.com

Список основных публикаций заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора Афанасьева С.С. по теме диссертации прилагается.

Подпись С.С. Афанасьева
заверяю: Учёный секретарь института
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского
Роспотребнадзора, д.б.н., профессор



Черникова Е.А.

« 30 » ноября 2017 г.