

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**на диссертационную работу Балабановой Ларисы Анатольевны
«Геномный анализ морских гетеротрофных бактерий, продуцентов щелочных
фосфатаз. Структура и свойства щелочной фосфатазы семейства *RhoA*»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.4. — Биохимия**

Диссертационное исследование Л. А. Балабановой посвящено решению комплекса приоритетных фундаментальных и прикладных задач по биоинформатическому и экспериментальному исследованию структурно-функциональной организации ферментов фосфорного обмена морских микроорганизмов, а также разработке на их основе биотехнологических платформ для нужд биомедицины.

Сегодня, в условиях развития биоэкономики, поиск новых природных биокатализаторов и расшифровка их практического потенциала приобретают особую государственную и научно-практическую значимость. Особенно хочется отметить актуальность представленной работы в свете стремительного роста антибиотикорезистентности клинически-значимых микроорганизмов, что требует поиска альтернативных антимикробных стратегий и инструментов модуляции микробиома, в том числе среди нетривиальных природных источников, к которым относятся гидробионты Мирового океана.

Рецензируемая работа базируется на сравнительном геномном и биохимическом анализе морских гетеротрофных бактерий типов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Эти микроорганизмы, эволюционировавшие в экстремальных условиях Мирового океана, обладают колоссальным потенциалом производства уникальных ферментов деградации нуклеиновых кислот, протеинов и углеводных полимеров, а также биосинтеза ценных вторичных метаболитов (осмолитов, антиоксидантов, биоцидов и экзополисахаридов).

С точки зрения реализации комплексного молекулярно-генетического и биохимического подхода диссертация Л. А. Балабановой выгодно отличается своей завершенностью. Автор предлагает не просто фундаментальное описание новых белков фосфорного обмена, а выстраивает логичный, завершенный технологический цикл: от биоинформатического поиска мишеней в бактериальных геномах до оптимизации получения рекомбинантных продуктов и их успешного экспериментального тестирования. Такой подход полностью отвечает современным запросам к наукам о живых системах.

Диссертация изложена на 354 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, представления обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 676 источников, и трех приложений.

Во введении автор четко формулирует научные проблемы, на решение которых направлены проводимые им исследования, их актуальность и приоритетность, цель и задачи работы, определяет научную новизну и практическую значимость своего исследования. Обзор литературы полностью соответствует теме работы. Он написан хорошим научным языком и свидетельствует о свободной ориентации автора в вопросах, связанных с темой диссертационного исследования, погружая читателя в особенности современных молекулярных подходов к изучению морских микроорганизмов, включая

технические и методологические сложности этого процесса.

Основной объем монографии занимает глава "Обсуждение результатов", в которой автор последовательно представляет все аспекты проведенного многопланового исследования, охватывающего широкий спектр задач: от таксономической ревизии и сравнительной геномики до детального изучения структуры, функции и биотехнологического потенциала одного конкретного фермента – щелочной фосфатазы семейства PhoA. Содержание главы полностью соответствует заявленным во введении целям и задачам.

Поскольку диссертационная работа Л.А. Балабановой представляет собой комплексное исследование, в котором органично переплетаются фундаментальные аспекты молекулярной биологии, геномики и эволюционной биохимии, новизна работы не ограничивается одним открытием, а проявляется на нескольких взаимосвязанных уровнях, создавая целостную научную платформу для пересмотра существующих представлений о функциональной роли щелочных фосфатаз и их биотехнологическом использовании.

Особенно хочется отметить, что в данной работе впервые предложена и обоснована принципиально новая парадигма, в рамках которой автор доказывает, что щелочные фосфатазы семейства PhoA являются универсальными регуляторами окислительно-восстановительного гомеостаза и энергетического метаболизма. При этом установлена связь между геномной локализацией гена *phoA* и его функцией. С помощью разработанного инструмента Syntenome показано, что ген *phoA* всегда локализован в одном кластере с генами электрон-транспортного комплекса *rsx/rnf*, а также с генами биосинтеза пуринов и контроля репликации, что позволяет связать фосфатазную активность с поддержанием редокс-баланса клетки, предотвращением деполяризации мембран и регуляцией клеточного цикла. Кроме того, на основе метаболического моделирования впервые выдвинута гипотеза, что щелочная фосфатаза может дефосфорилировать НАДФН до НАДН, тем самым переключая клетку с анаболического (антиоксидантного) режима на катаболический (энергогенерирующий). Этот механизм объясняет дозозависимое ингибирование биопленкообразования и пролиферации опухолевых клеток, наблюдаемое в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Работа также вносит значительный вклад в систематику морских бактерий, используя современные методы полногеномного и пангеномного анализа для пересмотра устоявшейся таксономии. Автором на основе масштабного полифазного скрининга штаммов из коллекции КММ ТИБОХ ДВО РАН впервые открыт новый род альфа-протеобактерий *Rhodalgimonas*, ассоциированный с красной водорослью *Anfelta* sp., и серия новых видов морских бактерий, принадлежащих к числу наиболее распространенных в Тихом океане родов морских бактерий типов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Проведена полногеномная реклассификация родов гамма-протеобактерий *Pseudoalteromonas* и *Cobetia*, а также флавобактерий *Arenibacter*, новые штаммы которых проявили высокий уровень продукции ферментов, обладающих высокой активностью и уникальной субстратной специфичностью. Впервые идентифицированы и аннотированы гены четырех семейств щелочных фосфатаз (PhoA, PhoD, PhoX, PafA) и их паралоги, формирующие видо- и штаммоспецифичный состав и масштабное внутригеномное разнообразие систем фосфорного обмена у всех исследованных в работе штаммов морских гамма-, альфа-протеобактерий и флавобактерий.

Впервые, используя полученный в ходе исследования бактериальный продуцент, автор проводит детальное изучение конкретного фермента - щелочной фосфатазы SmAP

семейства PhoA из *C. amphilecti*, сильно расширяя границы её применимости как биомедицинского препарата.

Именно эта часть работы, на мой взгляд, определяет основную практическую ценность всего исследования. Автором выдвинута гипотеза, что этот фермент, являясь потенциальным фактором вирулентности, способен снижать воспаление в тканях хозяина, которая впоследствии была блестяще подтверждена. Описан универсальный механизм противовоспалительного действия щелочной фосфатазы CmAP семейства PhoA из *C. amphilecti* через дефосфорилирование бактериальных липополисахаридов и расщепление сигнальных молекул воспаления (АТФ, ГТФ), прерывая тем самым каскад воспаления на ранней стадии. Противовоспалительное действие щелочной фосфатазы CmAP подтверждено в опытах на мышах с экспериментальным язвенным колитом. Продемонстрированное в экспериментах *in vitro* и *in vivo* ингибирование щелочной фосфатазой CmAP биопленкообразования бактерий и пролиферации опухолевых клеток также способно найти применение в практической медицине.

Важно отметить, что в ходе выполнения диссертационной работы автором созданы новые биотехнологические платформы для получения щелочной фосфатазы CmAP. Помимо традиционного продуцента в *E. coli*, разработана система получения CmAP в трансгенных растениях табака, свободная от бактериальных эндотоксинов, сконструированы бифункциональные гибридные белки CmAP с лектинами и поринами для высокочувствительной диагностики онкомаркеров и инфекций.

Таким образом, практическая ценность диссертационного исследования Л. А. Балабановой заключается в успешной трансляции фундаментальных биохимических и геномных открытий в прикладную плоскость и создании биотехнологических, биофармацевтических и программных продуктов, представляющих интерес для прикладной биомедицины и молекулярной фармакологии.

В целом, диссертационное исследование Л. А. Балабановой выполнено на высоком научном и методическом уровне – большая часть гипотез подкреплена экспериментом: получены рекомбинантные белки, проведен мутагенез, выполнены кинетические исследования, испытания на животных и растениях. Это придает выводам высокую степень достоверности, хотя часть из них сделаны исключительно на основании *in silico* анализа (синтении генов). Разработанное веб-приложение Syntenome автор использует не только как инструмент для визуализации, но и как основу для функциональных прогнозов, что может быть рискованно.

В рамках дискуссии хотелось бы обсудить следующие вопросы:

1. Существуют ли специфические генные сети, обуславливающие адаптацию представителей открытого Вами нового рода альфа-протеобактерий *Rhodalgimonas*, именно с макрофитными красными водорослями *Anfelia sp.*?
2. На основании синтении генов Вы выдвинули оригинальную концепцию о роли щелочной фосфатазы как специализированного регулятора редокс-баланса и осмотического гомеостаза, основанную на уникальном картировании локусов хромосомы. Это положение крайне интересно, однако механизмы такого влияния периплазматической фосфатазы на внутриклеточные процессы требуют пояснения. Какими экспериментальными данными подтверждается Ваша гипотеза об участии секретируемой щелочной фосфатазы в переключении клеточного метаболизма на антиоксидантные пути и в системном стресс-ответе?

3. До создания бактериального продуцента щелочной фосфатазы CmAP в *E. coli*, предпринимал ли автор попытку выделить нативный фермент непосредственно из *C. amphilecti* для более релевантного описания его свойств?

4. Поскольку автором обнаружена способность щелочной фосфатазы CmAP разрушать бактериальные биопленки, исследовался ли вопрос – влияет ли такое ферментативное разрушение матрикса биопленки на восстановление чувствительности бактерий к классическим антибиотикам?

5. При пероральной доставке инкапсулированного фермента мышам с индуцированным колитом, оценивал ли автор стабильность капсул и сохранение каталитической активности щелочной фосфатазы в отношении дефосфорилирования липополисахаридов непосредственно в дистальных отделах толстой кишки, где плотность грамотрицательной флоры максимальна?

6. Способность щелочной фосфатазы CmAP эффективно дефосфорилировать ЛПС грамотрицательных бактерий имеет колоссальное терапевтическое значение. Однако не обладает ли данный фермент способностью атаковать другие жизненно важные фосфорилированные метаболиты или сигнальные молекулы (например, нуклеотиды или фосфопротеины) в просвете кишечника, что могло бы вызвать побочные эффекты при длительном применении?

Высказанные вопросы носят исключительно дискуссионный характер, направлены на развитие предложенной автором концепции и не снижают высокую научную ценность диссертации.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ, ЛИЧНЫЙ ВКЛАД И ПУБЛИКАЦИИ

Достоверность представленных результатов подтверждается строгой воспроизводимостью данных, солидным объемом выборок и использованием передового набора методических инструментов – NGS, РТ-ПЦР, ИФА, а также презентацией этих результатов на многочисленных международных научных конференциях и публикациями в рецензируемых научных журналах.

Личный вклад автора является определяющим: под руководством Л.А. Балабановой были успешно защищены две кандидатские диссертации (В.А. Голотин, 2014 г. и Н.С. Буйновская, 2023 г.), частные результаты которых академически корректно, со строгим соблюдением правил цитирования, интегрированы в общую концепцию данной докторской работы. Публикации в ведущих международных журналах квартилей Q1/Q2 (Scopus/WoS) безоговорочно подтверждают мировой уровень исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Балабановой Ларисы Анатольевны «Геномный анализ морских гетеротрофных бактерий, продуцентов щелочных фосфатаз. Структура и свойства щелочной фосфатазы семейства PhoA», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия, является самостоятельным, завершенным квалификационным научным исследованием. В работе решена крупная научная проблема – сформирована и экспериментально доказана целостная концепция организации метаболизма, структуры, эволюционного происхождения и полифункциональной роли щелочных фосфатаз морских микроорганизмов в регуляции клеточного и системного гомеостаза.

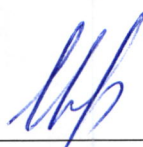
По объему выполненных исследований, уровню новизны, теоретической и практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям пунктов 9-14

«Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

Ее автор, Балабанова Лариса Анатольевна, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент:

Ильина Елена Николаевна,
заместитель директора по научной работе,
заведующий лабораторией математической
биологии и биоинформатики
Научно-исследовательского института
системной биологии и медицины
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека,
доктор биологических наук (специальность 1.5.4. – Биохимия)
профессор РАН, член-корреспондент РАН

 / Е.Н. Ильина /
«24»  2026 г



117246, Москва, Научный проезд, 18, Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора), ilinaen@sysbiomed.ru, тел. 8 (916) 600-57-64.

 Е.Н. Ильиной  завершено.
Начальник отдела кадров
ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора
