

ОТЗЫВ официального оппонента
на (о) диссертацию(и) на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Гаврюшиной Ирины Александровны
на тему: «Биологическая активность новых антимикробных пептидов -
эмерициллипсинов и разработка биотехнологии их получения»
по специальности 1.5.6. – «Биотехнология»

Актуальность темы исследования.

В мире наблюдается рост заболеваемости инвазивными грибковыми инфекциями, которые с трудом поддаются лечению существующими лекарственными препаратами. Существует проблема устойчивости условно-патогенных и патогенных грибов к противогрибковым препаратам. При этом на фармацевтическом рынке существует мало антимикотиков, и они токсичны. Все больше в качестве альтернативных терапевтических агентов привлекают внимание антимикробные пептиды.

В свою очередь изучение биологической активности новых антимикробных пептидов – эмерициллипсинов, и разработка биотехнологии их получения позволит решить проблему поиска и разработки новых природных антибиотиков для лечения поверхностных и инвазивных микозов. Методом ОФ-ВЭЖХ автором были выделены эмерициллипсины (EmiA-E). Оценка антимикробной активности показала, что эмерициллипсин А (EmiA) обладает противогрибковым действием в отношении клинических изолятов патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью. Метод мембранно-жидкостного культивирования на бактериальной целлюлозе позволяет увеличить выход целевого соединения. Итогом работы выступает разработанный лабораторный регламент получения нового противогрибкового пептида EmiA. В связи с этим работу Гаврюшиной И.А. следует признать актуальной на настоящее время.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Научная новизна работы состоит в том, что для 32 изолятов алкалофильных грибов вида *Emicellopsis alkalina* показана способность к образованию EmiA и для 15 изолятов этого вида установлена способность к образованию его гомологов EmiB-E. Охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида эмерициллипсины (EmiB-E), установлена структура их аминокислотных последовательностей. Обнаружена и охарактеризована дегидратированная форма EmiA у близкородственных видов рода *Emicellopsis*. Проведена оценка антифунгальной активности всех выявленных индивидуальных пептаиболов в отношении условно-патогенных коллекционных и клинических изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов. Показана цитотоксическая активность EmiA на опухолевые клетки колоректальной карциномы HCT116, за счет способности влиять на клеточный цикл и индуцировать апоптоз. Установлено низкое гемолитическое действие пептида, в концентрации 20 мкМ лизису подвергается не более 12 % клеток.

Представленная работа также имеет **практическое значение** в поиске и разработке новых антибиотиков для лечения поверхностных и инвазивных микозов. Установлено, что EmiA оказывает противогрибковое действие на патогенные и клинические изоляты рода *Aspergillus*, на клинические дрожжевые изоляты рода *Candida* и *Cryptococcus neoformans*. Разработан лабораторный регламент получения нового противогрибкового пептида EmiA из алкалофильного гриба штамма *E. alkalina* E101 в условиях стационарного мембранно-жидкостного культивирования на бактериальной целлюлозе.

Методология и методы исследований.

В работе использованы возможности современных микробиологических и химических методов. Полученные результаты исследований обработаны статистически, в том числе с применением

методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы оригинальны, обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу. Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических и практических вопросов в области биотехнологии.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Диссертационная работа Гаврюшиной И.А. изложена на 182 страницах по традиционному плану и включает разделы «список сокращений», «введение», «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты исследований», «заключение», «выводы», «список литературы», состоящий из 240 источников, в том числе 227 на английском языке и «приложение».

Во введении обосновывается актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены объекты и предмет исследования, отмечены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту. Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.6. – Биотехнология, представлен личный вклад автора.

Раздел **«Обзор литературы»** соответствует тематике данной работы, хорошо структурирован. В обзоре представлены общие представления об антимикробных пептидах. Подробно описаны антимикробные пептиды с противогрибковой активностью, выделенные из разных биологических объектов. Особое внимание было уделено структуре антимикробных пептидов, синтезируемых грибами, антифунгальной активности антимикробных пептидов, синтезируемых микроскопическими грибами и механизмы действия антимикробных пептидов на патогенные грибы. Также в обзоре кратко описан метод иммобилизации грибов на полимерных подложках для получения биологически активных веществ.

В разделе «**объекты и методы**» приведены объекты исследования и собственно методы исследования, использованные в работе. Методы соответствуют поставленным задачам и включают классические и современные микробиологические и химические методы. Автором проведено поверхностное, глубинное и мембранно-жидкостное на бактериальной целлюлозе культивирование штаммов рода *Emericellopsis*, экстракция. Методом ОФ-ВЭЖХ выделены индивидуальные соединения EmiA-E, методом масс-спектрометрии LC-ESI/MS/MS выявлены гомологи EmiB-E и определены их структуры, методом биоавтографии детектированы EmiA и его дегидратированная форма (dEmiA), определены фрагментации отдельных молекул EmiA и dEmiA методами MALDI-TOF MS и MALDI-TOF MS/MS. Проведена оценка биологической активности.

Раздел «**результаты исследования**» разбит на подразделы (3.1- 3.11) и соответствует поставленным задачам. В подразделах представлен подробный иллюстрированный материал с полученными в ходе исследования результатами в виде таблиц и графиков. В подразделе 3.1 автором был проведен скрининг 38 изолятов алкалофильных грибов рода *Emericellopsis*, выделенных из почв содовых и соленых озер, на способность к образованию антимикробного пептида – эмерициллипсин А (EmiA). Показано, что 35 штаммов относятся к виду *E. alkalina*, 2 штамма к *E. cf. maritima* и 1 штамм к *E. cf. terricola*. Автором установлено, что образование антибиотиков не является штаммоспецифичным признаком, однако количество пептаиболов различается в зависимости от штамма-продуцента. В подразделе 3.2 автор описывает, что помимо EmiA из концентратов культуральной жидкости штаммов *E. alkalina*, показавших наибольший выход пептида, были выделены и охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида эмерициллипсины (EmiB-E). Идентификация минорных соединений показала, что все четыре соединения являются гомологи EmiA с одиночными заменами аминокислотных остатков. В подразделах 3.3-3.4 автором было определено наличие дегидратированной формы EmiA в экстрактах двух

видов *Emericellopsis cf. maritima* и *Emericellopsis cf. terricola*. Также установлено, что EmiA и его дегидратированная форма (dEmiA) проявляют одинаковую антифунгальную активность в отношении грибов *Aspergillus niger* и *Candida albicans* с минимальной ингибирующей концентрацией 4 и 2 мкг/мл. **Подраздел 3.5** описывает результаты исследования образования эмерициллипсинов в культуральной жидкости и мицелии типового штамма *E. alkalina* E101 при различных значениях pH от 7 до 10 в поверхностных и глубинных условиях культивирования в динамике на 7, 14 и 21 сутки. Установлено, что оптимальным значением pH среды в глубинных условиях является pH 7, а в стационарных условиях - диапазон щелочных значений pH от 9 до 10, оптимальная длительность процесса для этих способов культивирования составляет 14 суток. Отмечается, что при поверхностном культивировании максимальное количество EmiA содержится в культуральной жидкости и составляет 6-6,5 мг/л, а при глубинном культивировании в мицелии 0,14-0,17 мг/г. Особое значение было уделено разработке технологии роста продуцента в стационарных условиях на бактериальной целлюлозе с целью увеличения выхода целевого соединения EmiA. Показано, что при росте на бактериальной целлюлозе происходит увеличение выхода пептида в 1,7 раза в сравнении со стационарным способом культивирования и в 2,3 раза в сравнении с глубинным культивированием, а также синтезируются и гомологи EmiB и EmiC. В **подразделе 3.6** дана оценка антифунгальной активности для всех выделенных соединений в отдельности. Установлено, что EmiA проявляет высокую активность как в отношении условно-патогенных коллекционных и клинических изолятов *Aspergillus*. Антифунгальная активность гомологов снижается в ряду А-Е. В **подразделе 3.7** подробно исследована антифунгальную активность EmiA на панели клинических изолятов дрожжей. Установлено, что EmiA ингибирующая активность EmiA против *Candida spp.* и *Cryptococcus spp.* проявляется на уровне антифунгального препарата амфотерицина В в диапазоне 0,25-2 мкг/мл. В **подразделах 3.8-3.9**

автором была проведена оценка активности EmiA в отношении планктонных и прикрепленных клеток у культур грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и образованных ими биоплёнок с целью исследования возможного антибактериального действия. Исследование показало, что планктонные клетки тестируемых клинических бактерий проявляют слабую чувствительность к пептиду, минимальная биоцидная концентрация составляет от 12,5 до 50,0 мкг/мл, в зависимости от тест-штамма. Кроме того, установлено, что EmiA обладает ингибирующим действием на грамположительные бактерии из группы ESKAPE - клинически значимых возбудителей инфекционных заболеваний. **Подраздел 3.10** описывает исследования цитотоксической активности EmiA по отношению к опухолевым и нормальным клеточным линиям *in vitro*. Цитотоксическая активность EmiA была обнаружена только в отношении клеток колоректальной карциномы HCT116 на уровне противоопухолевого антибиотика доксорубицина, на нормальные клеточные линии пептид цитотоксическое действие практически не оказывает. Также проведена оценка влияния EmiA на рост опухолевых клеток колоректальной карциномы HCT116. Определено, что в концентрации 0,25 мкг/мл антибиотик индуцирует апоптоз и приводит к накоплению содержания ДНК в фазе G0/G1 и при концентрации 1,0 мкг/мл, эффективно снижает значение клеточного индекса (CI). В **подразделе 3.11** также исследована гемолитическая активность EmiA. Установлено, что для EmiA - свойственен низкий уровень гемолитической активности с отсутствием дозо-зависимого эффекта. Пептид при концентрации 20 мкМ демонстрирует 12,6%-ный гемолиз по сравнению со 100%-ным гемолизом пептидного антибиотика грамицидина С.

В заключении автор систематизирует результаты проделанной работы.

Выводы сформулированы четко и обоснованы, и полностью отражают представленный экспериментальный материал.

Кроме того, достоверность результатов подтверждается 5 публикациями в изданиях, индексируемых в базах данных, RSCI, Scopus и Web of Science, в том числе 3 в изданиях, входящих в первый и во второй квартиль по импакт-фактору, согласно рейтингу научных журналов SCImago, получением патента РФ № 2710377 «Способ получения противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А».

По представленной работе есть вопросы и замечания:

1. Вызывает вопрос сложная многоступенчатая система выделения эмерициллипсинов – каковы потери основного вещества на отдельных стадиях очистки и насколько это удорожает стоимость конечного продукта?
2. Приведенные расчеты по экономическим затратам на сырье и их экстраполяция на стоимость готовой лекарственной формы не совсем корректны, т.к. не учтены расходы на упаривание под вакуумом, ОФ-ВЭЖХ, лиофильную сушку и др. затраты.
3. Из приведенных в работе результатов не совсем ясно как оценивалась степень чистоты полученного препарата эмерициллипсинов и как ее планируется оценивать на производстве?
4. К сожалению, соискатель не приводит обоснование выбора бактериальной целлюлозы в качестве иммобилизации продуцента и оказывается ли влияние на выход антибиотика. Известно, что это достаточно дорогой материал, использующийся в настоящее время в медицине как покровный материал. Возможно ли применение других подложек для продуцента? Это могло бы существенно удешевить производство.
5. Диссертанту можно порекомендовать использовать более корректное формулирование фраз в работе.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям,

установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6. – «Биотехнология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Гаврюшина Ирина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – «Биотехнология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,

декан факультета биотехнологии и биологии,

Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего образования «Национальный исследовательский

Мордовский государственный университет имени Н. П. Огарёва»

Ревин Виктор Васильевич

Кон:

тел.:

Спец _____, по которой официальным _____

защищена диссертация:

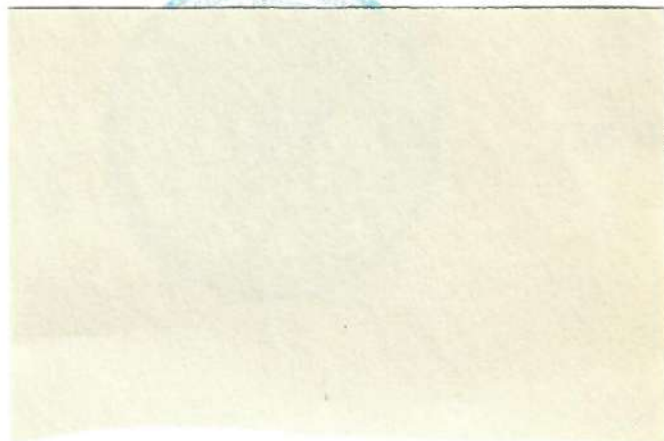
03.01.02 Биофизика (биол. науки)

Адрес места работы:

430005, (Республика Мордовия) г. Саранск, ул. Большевистская, д. 68,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский
государственный университет имени Н. П. Огарёва»,
факультет биотехнологии и биологии,
Тел.: +7 (8342) 243732; e-mail: mrsu@mrsu.ru

Первый проректор



ЕНИН