

## ОТЗЫВ

официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук Корниенко Елены Игоревны  
на тему: «Получение и свойства комплексов  
протеолитических ферментов тромболитического действия  
микровицетов *Arthrotrys longa* и *Sarocladium strictum*» по  
специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6.  
Биотехнология

### **Актуальность темы исследований.**

Диссертационная работа Корниенко Елены Игоревны посвящена изучению и сравнению комплексов протеолитических ферментов фибринолитического действия из микровицетов *Arthrotrys longa* и *Sarocladium strictum*. Тромбозы – это образование в сосудах плотных кровяных сгустков (тромбов), что приводит к замедлению или полному прекращению течения крови. В итоге нарушается недостаток питательных веществ, кислорода и, в конечном итоге, отмирание тканей, часто заканчивающееся летальным исходом. Следовательно, наличие эффективных, безопасных и дешевых средств борьбы с тромбозами является основой для спасения многих тысяч жизней и повышения качества жизни населения. В настоящее время в качестве подобных препаратов используют активаторы плазминогена, которые лизируют тромбы, активизируя собственную систему тромболизиса пациента, и в значительной степени сокращают количество обычных осложнений консервативного лечения: кровотечений и ретромбозов. К сожалению, многие средства обладают широким спектром побочных эффектов, таких как высокая токсичность, аллергенность и риски осложнений, а также характеризуются высокой стоимостью так как представляют собой зарубежные препараты. Поэтому поиск новых препаратов-фибринолитиков, способных осуществлять не только прямой лизис тромба, но и активировать собственную систему тромболизиса пациентов, путем активирования

плазминогена, является как актуальной задачей современной науки, так и основой лекарственной безопасности страны.

Перспективным источником новых фибринолитических препаратов являются протеазы грибов со свойствами белков системы гемостаза. В работе Корниенко Е.И. проведено исследование нового препарата Стриктолиаза, основанного на ферментах, образуемых микромицетом *S. strictum*, который обладает ярко выраженной активаторной к плазминогену активностью урокиназного типа и его сравнению с коммерческими аналогами, а также другими грибными препаратами, находящимися на стадии разработки. Также были подобраны оптимальные условия для выделения препарата и изучены особенности продуцента в глубинной культуре. В рамках работы был разработан и изучен прототип крема, в состав которого вошел препарат Стриктолиаза, и проведены начальные этапы доклинических исследований препарата, которые не выявили токсичных и аллергенных свойств данной субстанции. Поэтому полученные в работе результаты обладают как фундаментальной значимостью, расширяя знания о фундаментальных основах биотехнологии ферментов для медицинских целей, так и практической ценностью, поскольку направлены на решение проблем борьбы с социально значимыми заболеваниями.

#### **Содержание и структура диссертации.**

Диссертация изложена 172 страницах, содержит 18 таблиц, 54 рисунка и 139 литературных источника, из которых 64 – на русском и 75 – на английском языке. Работа содержит разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Приложение, Список цитируемой литературы.

Обзор литературы содержит подробную информацию о системе гемостаза, в особенности фокусируясь на системе фибринолиза. Отдельное внимание уделяется протеолитическим ферментам и протеолизу. Также

приведена подробная информация о протеазах грибов, находящихся на разных этапах исследований.

Раздел материалы и методы содержит различные микробиологические, биохимические, молекулярно-биологические и физиологические и статистические методы исследований как самих продуцентов, так и образуемых ими препаратов внеклеточных протеаз. Все приведенные методы подробно описаны и позволяют получить достоверные результаты.

Экспериментальная часть содержит 6 подразделов, которые полностью соответствуют цели и задачам работы. В первых двух приведены морфо-физиологические особенности микромицета *Arthrobotrys longa* и изучены некоторые особенности образуемого им препарата Лонголитин. В подразделе три приведена молекулярно-генетическая идентификация нового микромицета *Sarocladium strictum* 203. Подраздел четыре включает в себя определение потенциала нового штамма, подбор условий культивирования, а также сравнения активностей ранее не изученных протеаз *S. strictum* с протеазами микромицета *A. longa*. В подразделе пять подробно изучены биохимические свойства препарата, полученного из культуральной жидкости *S. strictum*, а также проведено сравнение выделенного комплекса с коммерческими аналогами и препаратами грибного происхождения. В последнем подразделе представлены результаты начальных доклинических испытаний и апробация кремовой субстанции для наружного применения для устранения гематом.

**Обоснование положений, выносимых на защиту, их достоверность и новизна.**

В работе Корниенко Е.И. исследованы особенности роста микромицета *A. longa*, а также проведена идентификация нового выделенного в результате работы микромицета *S. strictum*, установлен его гидролитический потенциал и определены оптимальные параметры для его культивирования в глубинных условиях. Впервые была обнаружена

полицикличность роста изучаемых продуцентов, а также её связь с выделением в среду экзопротеаз. Детальное изучение комплекса протеолитических ферментов Стриктолиаза, образуемого микромицетом *S. strictum*, а также его сравнение с коммерческими аналогами и препаратами грибного происхождения, в том числе с препаратом Лонголитин образуемым *A. longa*, показало его эффективность в качестве активатора плазминогена урокиназного типа. Путем фракционирования препарата Стриктолиаза обнаружены три активных протеазы в составе комплекса для которых был установлен класс и определена молекулярная масса. В работе приведены оптимальные условия работы выделенных компонентов комплекса, а также наглядно представлен механизм взаимодействия протеаз с субстратами фибриногена и плазминогена и определены оптимальные сроки хранения препарата. В работе представлены данные начальных этапов доклинических исследований, а также приведена апробация готовой кремовой формы для наружного применения для устранения гематом.

### **Сильные стороны работы**

В работе показана перспективность нового фибринолитического препарата Стриктолиазы, который в начальных доклинических исследованиях охарактеризован как эффективный препарат с ярко выраженной фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью.

В работах на животных проведен многосторонний безопасности препарата Стриктолиазы, что позволяет дать оптимистичные прогнозы относительно возможного применения препарата.

### **Замечания и вопросы**

В задаче 2 было бы полезно указать в каком направлении проводилась оптимизация среды, для максимального накопления фермента? Кроме того, известно что микромицеты в ходе роста закисляют среду, контролировали ли значение рН в ходе роста?

По мнению рецензента, для стандартизации условий культивирования (Раздел 2.1) необходимо использовать деионизованную воду с внесением стандартного набора микроэлементов (Spizizen, 1961), так как элементный состав водопроводной воды нестабилен даже в пределах одной системы.

Что является препаратом Стриктолиаза? Чистый фермент, комплекс фибринолитических ферментов или фракция культуральной жидкости? В последнем случае (скорее всего так, раздел 2.6) было бы полезно указать процент примесных белков, так как они могут быть иммуногенными.

В базе Genbank есть референсный геном *Sarocladium strictum* (ASM3043581v1), проводился ли анализ генов ферментов в геноме для оценки возможных кандидатных ферментов с учетом знаний молекулярной массы и pI? Определялось ли филогенетическое положение данного микромицета?

Есть ли какие-то предположения, за счет чего эффективность Стриктолиазы повышалась при добавлении в реакционную смесь гепарина?

Есть ли уже предполагаемая для практики лекарственная форма препарата и изучались ли ее характеристики?

Необходимо указать, что данные вопросы и замечания носят уточняющий и рекомендательный характер и не снижают научной и практической значимости работы.

### **Заключение.**

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), 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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук,

на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Корниенко Елена Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Каюмов Айрат Рашитович, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный университет», Институт фундаментальной медицины и биологии, Высшая школа биологии, кафедра генетики

Каюмов А.Р.

Дата, подпись

Адрес: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18

Телефон: +7(904)

E-mail: kairatr

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.04 – Биохимия,

03.02.03 – Микробиология