

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание учёной степени кандидата биологических наук Лавреновой Виктории Николаевны на тему: «Воздействие протеолитических ферментов микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза» по специальностям 1.5.11. Микробиология, 1.5.4. Биохимия

Предотвращение формирования тромбов при различных заболеваниях и расщепление уже возникших тромбов – серьезнейшая проблема, в решении которой участвуют наряду с медиками специалисты многих дисциплин, включая микробиологов и биохимиков. В мире ежегодно от тромбозов разного генеза умирает миллионы человек. Поэтому актуальность исследований в этой области очевидна. Продуценты протеаз с антикоагулянтными и фибринолитическими свойствами известны среди представителей многих организмов, одними из перспективных среди них являются грибы, и, в частности, микромицеты рода *Aspergillus*. Хотя известно более десятка известных продуцентов противотромботических протеаз среди аспергиллов, поиск новых продуцентов необходимо продолжать, так как многие существующие антикоагулянты и фибринолитики имеют побочные эффекты. Новые протеазы могут быть также востребованы при разработке диагностических наборов для оценки гемостаза людей.

Целью работы было провести скрининг протеолитической активности секретлируемых протеаз среди штаммов 22 малоизученных видов рода *Aspergillus*, отобрать новый перспективный продуцент противотромботических протеаз и изучить свойства его ферментного препарата.

Обзор литературы написан очень хорошо, детально, все его разделы логично связаны, а также сопряжены с решаемыми задачами в экспериментальной работе. В нем описаны системы гемостаза, особенности белков, связанных с образованием и разрушением тромбов; характеристики

противотромботических ферментов и препаратов, дана информация о бактериальных и грибных продуцентах таких энзимов. В заключении обзора можно было более четко акцентировать внимание на недостатках у различных, существующих препаратов, в особенности на тех из них, которые попытается автор устранить в ходе своего поиска продуцента протеаз.

Объекты и методы также очень подробные и замечаний к ним нет. Надо только добавить метод определения молекулярной массы фермента и сделать уточнение, что изучали влияние начального значения рН среды на продукцию штаммом протеаз. Необходимо дать пояснение, почему рН 8,2 взято в контроле при изучении стабильности и оптимума фермента. И, возможно, проверить рН в конечных растворах при определении оптимума активности фермента у отобранного штамма *A. tabacinus*.

Результаты и обсуждение.

Проведён скрининг протеолитической активности к различным белкам при поверхностном и глубинном режимах культивирования на 22 ранее неизученных штаммах рода *Aspergillus*, исследована их фибрино- и фибриногенолитическая активность.

Среди 22 исследованных видов рода *Aspergillus* при поверхностном культивировании 12 видов проявляли фибринолитическую активность совместно с фибриногенолитической, только фибринолитическая активность была обнаружена у 4 видов, только фибриногенолитическая – у 3. После глубинного культивирования значимая фибриногенолитическая активность была обнаружена у 17 видов. По результатам метода фибриновых пластин было выяснено, что ферменты 13 видов могут работать как прямые и непрямые фибринолитики, а ферменты 3 видов – только как непрямые фибринолитики. 6 исследованных видов продемонстрировали тромбин-подобную активность, 4 – фактор Ха-подобную, 2 – урокиназную, 3 – плазминоподобную и 7 – протеин С-подобную активность. 1 вид обладал активаторной к протеину С активностью. Сформулированы критерии отбора продуцентов противотромботических соединений.

На их основе отобраны 3 штамма, среди которых наиболее перспективным признан штамм *Aspergillus tabacinus*, секретирующий антикоагулянтную протеазу, проявляющую активности к белкам системы гемостаза. Это негликозилированный фермент с массой около 30 кДа, ингибируется соевым ингибитором трипсина, проявляет субстратную специфичность к протеину С, плазмину, фактору Ха, тромбину, имеет температурный оптимум - 55°C, рН-оптимум – 7-12, стабилен в диапазоне 25-37°C и рН 3-12.

Научная новизна работы. Впервые получены данные о субстратной специфичности секретируемых ферментов 22 штаммов рода *Aspergillus* по отношению к пептидным субстратам протеаз системы гемостаза, фибринолиза и противосвёртывающей системы. Выделена ранее неизвестная антикоагулянтная протеаза *A. tabacinus*, проявляющая протеин С-подобную, тромбин-подобную, фактор Ха-подобную и плазминоподобную активности, установлена её молекулярная масса, наличие гликозилирования, субстратная специфичность, устойчивость к ингибиторам, температурный и рН-оптимум и стабильность.

Теоретическая и практическая значимость. Установленные биохимические и физико-химические свойства внеклеточной протеазы *A. tabacinus* позволят установить возможный механизм работы фермента. Практическая значимость работы заключается в изучении потенциала 22 штаммов микромицетов в качестве продуцентов новых противотромботических средств. Произведена частичная очистка нового высокоактивного антикоагулянтного фермента, который имеет потенциал для последующего развития терапевтического средства против тромбозов.

Кроме небольших замечаний, указанных выше, неясно, почему в критериях отбора штаммов не указано отсутствие у штаммов гемоглоблинолитической и кератинолитической активностей.

Высказанные замечания не умаляют достоинства работы, она большая, хорошо оформленная, вносит заметный вклад в поиск грибных ферментов,

влияющих на белки системы гемостаза, результаты достоверны и выводы соответствуют полученным данным, публикации отражают содержание диссертации.

Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия (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. Работа 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 Лавренова Виктория Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия (по биологическим наукам).

Официальный оппонент:

Кураков Александр Васильевич,

доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой микологии и альгологии Биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Контактные данные:

Тел.: 8(495)9393970, Email: kurakov

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.03 – Микробиология (биологические науки), 03.02.13 – Почвоведение

Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
Биологический факультет