

## ОТЗЫВ

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

Диссертационное исследование Лавреновой Викторией Николаевной посвящено поиску секретируемых протеолитических ферментов среди 22 штаммов микромицетов рода *Aspergillus*, выделению и характеристике протеазы, обладающей антикоагулянтной (протеин С-подобной) и тромболитической активностями одновременно. Протеазы микроорганизмов, обладающие протеин С-подобной активностью, ранее не были описаны, что определяет новизну исследования для биохимии и микробиологии. Исследование имеет также биомедицинскую направленность, т.к. на основе такого фермента возможно создание терапевтического препарата с двойным действием (разрушение тромбов и предотвращение образования новых). Ожидаемое преимущество подобных препаратов заключается в снижении/отсутствии побочных эффектов, упрощении технологии их получения и, соответственно, их удешевлению. Таким образом, тема диссертационной работы Лавреновой В.Н. «Воздействие протеолитических ферментов микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза» актуальна.

Диссертация написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения экспериментальных данных, обсуждения результатов, заключения и списка цитированной литературы, содержащего 257 источников.

В разделе «Введение» автор раскрывает актуальность диссертационного исследования для медицины, а именно для проблем, связанных с тромбообразованием. Отмечается роль ферментов микробного

происхождения с тромболитическими свойствами для создания терапевтических препаратов. Автор обосновывает выбор микромицетов рода *Aspergillus* для поиска секретируемых ферментов с целевыми активностями широтой экологических ниш и способностью секретировать необходимые протеолитические ферменты для приспособления к различным условиям среды обитания. Отмечается необходимость поиска ферментов с двойными активностями, с тромболитической и антикоагулянтной. Также обосновывается поиск антикоагулянтной протеин С-подобной активности у выбранных штаммов, т.е. активности, похожей на активность человеческого протеина С. В конце введения формулируется цель диссертационного исследования и задачи.

Обзор литературы разделен на три части: система образования и расщепления тромбов; противосвертывающие и тромболитические препараты; микро- и макромицеты как перспективные продуценты антикоагулянтных и фибринолитических ферментов. Логика построения обзора понятна. Научный интерес автора - ферменты с перспективой применения для лечения болезней свертываемости крови. Первым двум разделам посвящена значительная часть обзора. Безусловно, эти разделы нужны и интересны, но представленная информация избыточна. При этом, нет информации про препараты человеческого протеина С (не рекомбинантного), получаемого из плазмы крови. Третий раздел обзора литературы посвящен непосредственно теме диссертационного исследования. В начале этого раздела автор пишет, что «... грибные продуценты гидролитических ферментов обладают большим по сравнению с бактериями разнообразием секретируемых протеаз». Даются ссылки на две работы (Wandersman С. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases // *Mol Microbiol.* 1989. 3, 12, 1825-1831; Павлюкова Е.Б. и др. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // *Биохимия.* 1998. 63, 8, 1059-1089). Однако в этих работах такое сравнение не прослеживается. Было бы информативно включить в обзор литературы раздел о секретируемых

протеазах микромицетов. После некоторой доработки третья часть может быть опубликована в виде научного обзора. В завершении обзора литературы автор резюмирует, что ферментов микромицетов с антикоагулянтной активностью известно крайне мало, отмечена недостаточная изученность уже известных ферментов и обосновывается актуальность поставленных в диссертационном исследовании задач.

Для решения поставленных задач автор использовал классические микробиологические и биохимические методы. Скрининг искомым протеолитических активностей осуществлялся с использованием специфических белковых и хромогенных пептидных субстратов. Для очистки протеазы использовался метод изоэлектрофокусирования. К данному разделу имеется комментарий: В п 2.1 «Объект исследования» было бы целесообразным указать, из каких мест обитания были выделены исследуемые штаммы, тем более в разделе «Введение» был сделан акцент на широту экологических ниш, занимаемых микромицетами и связанную с этим способность продуцировать широкий спектр протеолитических ферментов.

Основные научные результаты, полученные автором.

1. Скрининг протеолитической активности у 22 штаммов *Aspergillus* на средах, содержащих казеин, желатин, гемоглобин, фибрин, фибриноген, кератин при поверхностном культивировании (п. 3.1). На рис. 8 приведены фотографии чашек Петри с зонами гидролиза белковых субстратов вокруг колоний некоторых штаммов. В результате этого эксперимента была установлена способность изучаемых штаммов гидролизовать выбранные субстраты в разной степени. К рисунку 8 имеется комментарий: в подписи к рисунку следовало указать, какие именно штаммы представлены.

2. Скрининг протеолитической активности при глубинном культивировании с использованием двух сред культивирования. В данном эксперименте протеолитическую активность измеряли в культуральной жидкости 22 штаммов после 96 ч культивирования с использованием в качестве субстрата азоказеина, голубого фибрина, фибриногена и

гемоглобина. К данному разделу имеется комментарий: из описания результатов, приведенных в таблице 9, так и непонятно, у какого штамма самая высокая фибринолитическая активность. Из таблицы 9 следует, что у штамма *A. aureolatus* (250 E) при культивировании на среде 2. Однако в описании результатов этот штамм не отмечен как обладающий самой высокой фибринолитической активностью. Описание результатов сопровождается неколичественными оценками полученных значений, а такими как «довольно высокая», «не очень высокая», «крайне незначительная», «достаточная». Такой стиль изложения затрудняет анализ. Поскольку прослеживается сравнительный характер описания результатов, то следует приводить конкретные значения.

3. Скрининг протеолитической активности с использованием хромогенных субстратов для протеаз, специфичных к тромбину, фактору Ха, протеину С, а также субстратов ферментов фибринолиза плазмينا и урокиназы. Конкретный результат этого исследования сформулирован на стр. 83: «Единственным перспективным продуцентом активаторной протеазы оказался *A. melleus* после роста на ФС2, его активность по отношению к S-2366 составила более  $40 \text{ E} \times 10^{-3}$ ». Не хватает такого же конкретного заключения и по прямым активностям.

4. На следующем этапе экспериментальных работ был использован метод фибриновых пластин для поиска целевых активностей у 22 штаммов. Сразу возникает вопрос: почему этот метод был использован для всех 22 штаммов? На предыдущем этапе исследований «... было обнаружено, что 14 из 22 исследуемых видов ... обладают низкой протеолитической активностью ( $\leq 15 \text{ E} \times 10^{-3}$ ) по отношению ко всем использованным субстратам, следовательно их протеазы не могут быть перспективными для разработки противотромботических средств». Почему эти 14 видов не были отброшены сразу на основании предыдущего скрининга? В результате этого эксперимента был сделан вывод: «Прямой фибринолитической активностью после культивирования хотя бы на одной среде обладали 13 исследуемых видов, при

этом все они также обладали активаторной активностью разной степени выраженности. Помимо этого, только активаторная, то есть непрямая фибринолитическая активность, была обнаружена ещё у трёх видов (*A. calidoustus*, *A. penicilloides*, *A. ruber*), остальные виды не представляют практического интереса, так как не проявляют способности к лизису в условиях реального фибринового сгустка» (стр. 92).

5. Сформулировано четыре критерия отбора перспективного продуцента на основании результатов проведённых измерений. Согласно этим критериям наиболее перспективным видом является *A. tabacinus*. Поскольку по результатам исследования прослеживаются и другие перспективные штаммы, обладающие фибринолитической и антикоагуляной активностями, например, *A. tennesseensis*, то обоснованность использования всех четырех критериев неочевидна. Для отсеивания штамма *A. tennesseensis* автор использует формулировку «... так как проявляет широкую специфичность по отношению к хромогенным пептидным субстратам». Из таблицы 10 следует, что оба штамма проявляют активность на всех выбранных хромогенных субстратах. Их суммарная активность практически не отличается. При этом протеин С-подобная активность и активность в отношении субстрата Chromozym ТН были одного порядка. Поскольку предполагается дальнейшая очистка протеазы, то такой подход выбора продуцента непонятен. Также отмечу, что широкая специфичность действия культуральной жидкости вовсе не означает, что в ней находятся отдельные широкоспецифичные протеазы. Для протеолитических ферментов характерны синергетические эффекты, которые могут усиливать общую протеолитическую активность. Только для гомогенного фермента можно определить широкая у него специфичность или узкая, проведя соответствующие исследования. К данному разделу вопрос: почему недостаточно было ограничиться только экспериментами по измерению специфических активностей с использованием хромогенных субстратов и с использованием метода фибриновых пластин для выбора перспективного продуцента?

6. Изучение динамики накопления протеаз *A. tabacinus* в культуральной жидкости. Накопление протеаз оценивали по содержанию общего белка в культуральной жидкости, по общей протеолитической активности на азоказеине и по активности на двух хромогенных субстратах (протеин С-подобная и тромболитическая активности). Использовали две ферментационные среды. По результатам этого эксперимента было сделано заключение, что для выделения препарата специфических протеаз *A. tabacinus* оптимальной средой культивирования является среда 2, время культивирования 7 суток.

7. Определение влияния рН и температуры на продукцию протеаз. Замечание: нет контроля на прирост биомассы. Без измерения прироста биомассы продуцента при различных условиях культивирования нельзя оценивать влияние выбранных параметров на любую продукцию. рН и температура – факторы, влияющие на рост биомассы микроорганизмов. При разном количестве биомассы удельная продукция целевых ферментов (например, Е/мг сух. веса биомассы или Е/мг сырого веса биомассы) может существенно различаться.

8. Выделение и очистка протеазы. Для этого использовали осаждение белков сульфатом аммония из культуральной жидкости *A. tabacinus* после культивирования штамма на среде 2 в течение 7 дней и изоэлектрофокусирование. В результате получена фракция «внеклеточной протеазы». На рис. 14 приведена электрофореграмма белков этой фракции. На ней видно, что фракция эта имеет 4 мажорные полосы! Можно допустить, что в каждой из этих полос может быть не один белок. Сделана зимограмма, на основании которой автор делает заключение, что во фракции присутствует одна протеаза с молекулярной массой 30 кДа. В тексте нет информации о доочистке фермента до гомогенного состояния и методов (гельфильтрация, MALDI-TOF), которые подтверждали бы степень очистки. Следовательно, все последующие исследования, связанные с характеристикой «протеазы», проведены не с гомогенным белком. Для этого препарата, содержащего

балластные белки, были определены оптимальные значения рН и температуры для проявления активности на субстрате S-2366. Проведен ингибиторный анализ. Замечание к этой части имеет принципиальный характер: нельзя делать вывод «Впервые выделена протеаза...», т.к. препарат не гомогенный.

Раздел «Обсуждение результатов» читается легко и с интересом, и заканчивается выводами. Первую часть четвертого вывода следовало формулировать аккуратнее, т.к. протеаза не была очищена до гомогенного состояния.

Заключение: диссертационная работа В.Н. Лавреновой является законченным самостоятельным исследованием, посвященным получению новых знаний о продукции протеолитических ферментов у 22 различных видов *Aspergillus*. Результаты указывают на то, что эти штаммы могли быть использованы для поиска и выделения специфических ферментов, обладающих фибринолитической и антикоагулянтной активностями. Поиск, изучения и характеристика таких ферментов актуальна для медицины, т.к. ферменты с такими активностями могут быть использованы в качестве основы для создания лекарственных препаратов для лечения болезней свертываемости крови. Это определяет практическую значимость полученных результатов. В работе использованы классические методы биохимии и микробиологии. Обработка данных проведена с использованием статистических методов анализа. Выводы диссертационной работы в целом соответствуют поставленным задачам. Результаты диссертационной работы прошли апробацию на российских и международных конференциях. По материалам диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых журналах.

Отмеченные недостатки не снижают общей хорошей оценки работы. Высокая актуальность темы работы требует продолжения проводимых исследований.

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:

Кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник Института биохимии  
и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрыбина – обособленного  
подразделения Федерального исследовательского  
центра «Пушкинский научный  
центр биологических исследований  
Российской академии наук» \_\_\_\_\_ (Леонтьевская  
Наталья Валерьевна)

22.05.2024 г.

Контактные данные:

Тел. сл. 8(4967)738620 (добавочный 590),

Эл. почта: vasilyeva

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация: 03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы:

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина – обособленное подразделение  
Федерального исследовательского  
центра «Пушинский научный  
центр биологических исследований  
Российской академии наук»  
142290, Пушкино, проспект Науки, д. 5. Веб-сайт: [www.pbcras.ru](http://www.pbcras.ru)