

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 микромицетов
***Arthrobotrys longa* и *Sarocladium strictum*»**
по специальностям 1.5.11. – микробиология и 1.5.6 – биотехнология

Актуальность избранной темы исследования. В современных условиях крайне востребованными становятся препараты тромболитического действия. Без них невозможно лечение осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, послеоперационных состояний, а также последствий коронавирусной инфекции. Арсенал существующих фармакологических препаратов ограничен и нуждается в пополнении за счет новых соединений, обладающих высокой эффективностью и низкими побочными рисками.

Грибы являются своеобразной природной лабораторией, в которой создаются и отбираются самые разные биологически активные соединения. Они известны и как продуценты гидролитических ферментов, широко используемых в биотехнологии и фармакологии. Задача исследователей найти их, изучить и отработать методики получения.

В связи с этим выбор диссертанта упал на грибы, для которых была показана протеолитическая активность. Отобран как совершенно новый продуцент, так и известный ранее, который уже показал свою активность в образовании комплекса тромболитических экзопротеаз. Целью диссертационной работы стало изучение нового перспективного продуцента фибринолитических ферментов *Sarocladium strictum* 203 и образуемого им комплекса экзопротеаз и сравнение его с известным продуцентом *Arthrobotrys longa*.

Обоснованность положений, выносимых на защиту обусловлена очень большим объемом и детальностью проведения исследований как

самых культур продуцентов, так и образуемых ими комплексов биологически активных веществ и их отдельных компонентов, с применением микробиологических, биохимических, физиологических, статистических и биоинформатических методов и подходов. Очень важно, что выполнены все необходимые предварительные шаги по пути к получению фармакологического средства, вплоть до доклинических испытаний препарата. Особую ценность исследованию придает выполненное сравнение разрабатываемого препарата Стриктолиаза с существующими коммерческими аналогами и другими препаратами грибного происхождения, в результате которого продемонстрирована его перспективность для фармакологии.

Обоснованность и достоверность научных выводов, сформулированных в диссертации подтверждена хорошо продуманными и тщательно выполненными с достаточным количеством повторностей экспериментами и их воспроизводимостью. Проведенной статистической обработкой. Подтверждением идентификации культуры молекулярно-генетическим методом. Публикациями в высокорейтинговых рецензируемых международных журналах.

Научная новизна работы. В исследовании Корниенко Елены Игоревны детально изучен совершенно новый продуцент комплексов протеолитических ферментов тромболитического действия и продемонстрированы его преимущества по сравнению с существующими препаратами. Проведен широкий спектр исследований по изучению двух препаратов Лонголитина и Стриктолиаза с выраженной фибринолитической активностью. Впервые охарактеризованы особенности роста и динамики накопления культурами экзопротеаз, для которых определены оптимальные условия работы, такие как рН и температурный оптимум и показатели стабильности данных протеаз.

Теоретическая и практическая значимость работы. Корниенко Еленой Игоревной получены очень важные фундаментальные результаты

по выявлению динамики роста и продуктивности культур штаммов-продуцентов с эндогенным биоритмом, соответствующим максимумам выхода фибринолитических экзопротеаз в среду. Эти данные необходимы для разработки рекомендаций и регламентов промышленного культивирования продуцента.

Также в исследовании заложены основы для разработки фармакологического продукта. Впервые проведены начальные доклинические исследования Стриктолиазы, показавшие, что данный препарат не обладает аллергическими и цитотоксическими свойствами.

Важным итогом работы является получение патента РФ «Штамм *Sarocladium strictum* – продуцент фибринолитических ферментов с активаторной к плазминогену активностью».

Общая характеристика работы. Рассматриваемая работа изложена на 172 страницах, содержит 18 таблиц, 54 рисунка и 2 приложения. Структурно диссертация состоит из введения, 3 глав основной части, заключения и выводов, списка использованной литературы и приложения. Список литературы содержит 139 работ, в том числе 75 на иностранных языках.

Материалы диссертации были представлены на 11 международных и всероссийских конференциях, по результатам получен 1 патент и опубликовано 5 печатных работ, из них 4 статьи в изданиях, индексируемых в базах данных RSCI, Scopus и Web of Science, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

Содержание работы. В работе содержатся все требуемые разделы, оформление соответствует рекомендациям для диссертационных работ. Текст автореферата соответствует основному содержанию диссертации.

Первая глава «Обзор литературы» посвящена анализу современных взглядов на системы свёртывания и противосвёртывания крови, компиляции сведений о протеолизе и протеолитических ферментах системы гемостаза и классу пептид-гидролаз. Подробно рассмотрены протеолитические

ферменты грибов, способные к селективному протеолизу компонентов плазмы крови, особое внимание уделено препаратам Триаза и Лонголитин.

Во второй главе «Материалы и методы» подробно изложены особенности культивирования изучаемых продуцентов и методы проведения более 18 разных исследований и экспериментов, как самих культур продуцентов, так и целевого продукта.

Третья глава «Результаты и обсуждение» посвящена описанию и обобщению итогов работы и содержит 25 разделов, подробно представляющих результаты, полученные в ходе работы. Они хорошо структурированы и четко изложены, иллюстрированы таблицами, графиками, диаграммами, рисунками и фотографиями. Особенно важно, что в работе детально исследованы три протеазы, входящие в комплексный препарат Стриктолиаза. Был установлен класс протеаз путем проведения ингибиторного анализа, а также выявлена способность гепарина увеличивать активность протеаз с активаторной к плазминогену активностью. Определена молекулярная масса компонентов комплекса, а также содержание гликопротеинов в протеазах.

Завершает диссертационную работу заключение, где рассматриваются перспективы для медицины, которые имеет тромболитический препарат Стриктолиаза, полученный из культуральной жидкости микромицета *Sarocladium strictum*, обладающий суммарным фибринолитическим, тромболитическим, активаторным к плазминогену эффектами и незначительным общим протеолитическим действием.

Выводы диссертации обоснованы, полностью вытекают из ее содержания и соответствуют целям и задачам исследования. Научные положения, выносимые на защиту также обоснованы.

Завершает работу обоснованная рекомендация, к рассмотрению микромицета *S. strictum* 203 как биотехнологически перспективного продуцента, а исследованную субстанцию в качестве перспективного лекарственного средства.

Замечания к работе. Несмотря на целостность и масштабность проведенного исследования, к работе есть несколько пожеланий и вопросов.

Штаммы продуцентов желательно передать на ответственное хранение в коллекции микроскопических грибов, имеющие официальный статус, Всероссийская коллекция микроорганизмов ВКМ (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН) или Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ВКПМ (Национальный биоресурсный центр НИЦ «Курчатовский институт»).

Полученные в результате молекулярно-генетических исследований последовательности нуклеотидов должны быть депонированы в базу данных GenBank.

В обзоре литературы, при детальном анализе истории штамма-продуцента *Arthrobotrys longa*, отсутствует работа с первоописанием данного вида, где как раз описана морфология и происхождение именно той культуры, которая стала продуцентом препарата Лонголитин (Мехтиева Н. А. Новые виды хищных грибов рода *Arthrobotrys* Corda // Новости систематики низших растений. 1973. Т. 10. С. 174–179.)

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Корниенко Елены Игоревны «Получение и свойства комплексов протеолитических ферментов тромболитического действия микромицетов *Arthrobotrys longa* и *Sarocladium strictum*» 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 (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 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 01.5.11. – микробиология и 1.5.6 – биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник кафедры микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Александрова Алина Витальевна

07 декабря 2023 г.

Контактные данные:

тел.: [REDACTED]

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.12 – «Микология» (биол. науки)

Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра микологии и альгологии

Телефон: [REDACTED]

Подпись доктора биологических наук А.В. Александровой удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета МГУ

Е.В. Петрова

07 декабря 2023 г.