

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Шамрайчук Ирины Леонидовны на тему: «Внеклеточная активность пептидаз сапротрофных и фитопатогенных мицелиальных микромицетов» по специальности 1.5.18 – микология

Протеолитические ферменты играют исключительно важную роль в обмене веществ у всех живых организмов, участвуя в регуляции различных биологических процессов на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Их большое разнообразие, широкая субстратная специфичность, устойчивость в экстремальных условиях объясняют эффективность использования пептидаз как при гидролизе макромолекулярных субстратов, так и в инициировании и поддержании процесса патогенеза. К исследованию пептидаз по праву привлечено пристальное внимание, обусловленное не только их огромным физиологическим значением, но и широким применением в научных исследованиях и в различных областях хозяйственной деятельности, таких как легкая и пищевая промышленность, медицина и фармакология. Среди внеклеточных протеолитических ферментов микроорганизмов особое место занимают пептидазы, обладающие высокой фибринолитической и антикоагулянтной активностью, что предполагает их высокий терапевтический эффект при лечении тромбоэмболии и использовании в составе препаратов для удаления некротизированных тканей и гнойных выделений. С участием грибных пептидаз разрабатываются различные способы рециклизации отходов, что помогает сберечь окружающую среду.

Возрастающий интерес к секрецируемым пептидазам грибов во многом обусловлен их участием в разнообразных формах патогенеза. Предполагается, что грибные пептидазы могут участвовать в комплексе с другими ферментами в проникновении патогена внутрь растения-хозяина, подавлении защитных реакций растения и обеспечении патогена питанием, либо быть ответственными за регуляцию других ферментов, синтезируемых организмом. Однако ни число и состав участников этого процесса, ни место пептидаз в нем до конца не выяснены. Использование пептидаз для энзимотерапии некоторых болезней, постоянное развитие пищевой, фармацевтической и косметической отраслей промышленности требуют разработки и внедрения новых эффективных препаратов пептидаз или разработку препаратов, содержащих контролируемый набор нескольких ферментов с участием пептидаз.

Микромицеты обладают огромным потенциалом, продуцируя гидролазы широкой субстратной специфичности стабильные в различных условиях. Пока недостаточно

изученными остаются структурно-функциональные характеристики большинства грибных ферментов, очень мало данных о механизмах регуляции их активности. Мало исследованным остается их участие в адаптации патогена к меняющимся трофическим условиям. Поиск среди микромицетов новых, эффективных пептидаз направленного действия, а также изучение физиологии их образования, особенностей их структуры и функционирования представляется актуальной задачей как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Именно эту актуальную задачу и решает диссертационное исследование И.Л.Шамрайчук.

Диссертация И.Л.Шамрайчук, направленная на изучение пептидаз сапротрофных и фитопатогенных мицелиальных грибов и, в частности, их участия в патогенном процессе, построена по общепринятым плану и состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части, включающей в себя разделы «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», и списка цитированной литературы.

Литературный обзор обобщает значительное количество информации, имеющейся по теме диссертационной работы, и дает четкую картину современного состояния проблемы. В обзоре подробно рассмотрены современные представления о факторах и стратегии, используемых грибами для колонизации растительных тканей, различные подходы к классификации пептидаз и общая характеристика протеолитических ферментов различных классов, физиологическая роль и практическое применение пептидаз, разнообразие и особенности внеклеточных пептидаз мицелиальных грибов, комплексное действие пептидаз с вторичными метаболитами в процессе патогенеза, проанализированы данные об ингибиторах пептидаз как регуляторах активности эндогенных ферментов и как защитников пищевых ресурсов от конкурирующих организмов.

Литературный материал изложен ясно, четко и доступно, с использованием большого количества необходимых деталей и демонстрирует компетентность и эрудированность автора в данной области. К достоинствам обзора можно отнести множество обобщений и собственных выводов, сделанных автором.

В разделе «Материалы и методы» представлен спектр микологических и биохимических современных методов, использование которых полностью соответствовало поставленным автором экспериментальным задачам. Раздел написан основательно и подробно. Несомненно высокий методический уровень и умелое владение автором описанными методами явилось залогом успешного выполнения работы. В качестве недочета хотелось бы указать на отсутствие в методах описания определения

активности аспартильных пептидаз и единообразия в сокращении видовых названий использованных грибов.

Анализ полученных результатов показал, что представленное диссертационное исследование является оригинальной научно-квалификационной работой, обладающей необходимым уровнем научной новизны. К наиболее существенным результатам диссертационной работы можно отнести следующие:

- выявлены наиболее активные продуценты пептидаз, перспективные как возможные объекты для биотехнологии;
- определено, что спектр пептидаз, секрецируемых мицелиальными грибами, относящимися к различным таксонам и эколого-трофическим группам видоспецичен, тогда как количественные характеристики секрецируемых ферментов – штаммоспецифичны;
- показано, что появление и уровень секрецируемых пептидаз прямо зависят от наличия в среде культивирования белкового субстрата, причем не только в виде отдельного белка, но и в составе сложной структуры;
- прослежена связь секреции пептидаз с определенными фазами развития гриба;
- дополнено представление об индукторе появления секрецируемых пептидаз, в качестве которого может выступать изменение pH среды в процессе культивирования;
- обнаружено, что смена белкового индуктора приводит к количественным, но не качественным изменениям в спектре протеолитических ферментов
- идентифицированы возможные молекулярные компоненты процесса фитопатогенеза

Впервые в этом исследовании была показана связь между уровнями образования меланина и внеклеточной активностью пептидаз у агрессивных штаммов фитопатогенного гриба. Весьма интересным оказался и факт присутствия у мицелиальных грибов секрецируемых ингибиторов пептидаз, не связанных с регуляцией активности собственных протеолитических ферментов, а выполняющих, по-видимому, защитную функцию. Особенno следует отметить обнаружение ингибитора аспартильных пептидаз, так как природные белковые ингибитора аспартильных пептидаз встречаются довольно редко. Автору удалось установить, что для исследованных фитопатогенов характерно присутствие в среде трипсин-подобных пептидаз, которые могут рассматриваться как маркеры и участники патогенного процесса. Полученные результаты не только обладают научной новизной, но и имеют практическое значение, так как могут найти практическое применение в разработке новых методов защиты растений от фитопатогенов, для

диагностики патогенных микроорганизмов и получения растений, трансформированных генами ингибиторов пептидаз, с повышенной устойчивостью к патогенам.

Обсуждая результаты, И.Л. Шамрайчук продемонстрировала свою эрудицию и умение использовать литературные данные для научной дискуссии и обоснования определенной интерпретации своих экспериментальных результатов.

Как и любое глубокое научное исследование, диссертационная работа И.Л.Шамрайчук не лишена ряда недостатков. Есть несколько вопросов и замечаний к полученным ею результатам:

1) данные, приведенные в табл. 12 и 13 не дают представления о том, как изменялся рост культур грибов при частично и полностью анаэробных условиях. Стоило бы в эти таблицы добавить столбцы с весом мицелия после 3-х дневной инкубации в условиях ограниченного содержания кислорода.

2) Диссертанту стоило бы обсудить, с чем связано отсутствие аспартильных пептидаз у ряда изученных видов грибов (*Alternaria* и *Fusarium*)? С их отсутствием в геноме или отсутствия индуктора в виде кислого pH? Не пытался ли автор вызвать появление аспартильных пептидаз искусственно поддерживая низкий pH в культуральной среде? Не может ли отсутствие аспартильных пептидаз быть связано с разными сроками измерения активности в культуральной жидкости?

3) Субстрат БАПА, применяемый диссидентом для определения трипсин-подобной активности, используется и для определения активности цистеиновых пептидаз. Не может ли быть так, что определяя активность трипсин-подобных ферментов, диссидент на самом деле фиксирует активность цистеиновых пептидаз?

4) Результаты в табл. 15-17, указывают на возможность присутствия секретируемой протеолитической активности и в отсутствие индуктора. Не значит ли это, что белковый индуктор не всегда обязательен для синтеза внеклеточных пептидаз?

5) Диссиденту стоило бы в заключении обсудить связь различий в спектрах пептидаз различных микромицетов с различиями их эколого-физиологических характеристик.

Следует заметить, что указанные замечания носят непринципиальный характер и не меняют общей положительной оценки работы. В целом экспериментальный материал, полученный в настоящей работе, и сделанные на его основе выводы представляют значительный интерес и являются заметным шагом к пониманию участия пептидаз мицелиальных грибов в процессе патогенеза. В заключении содержатся выводы о проделанной работе, которые подтверждают достижение диссидентом цели исследования

и решения всех его задач, намечаются перспективы дальнейших исследований. Список литературы полно отражает ссылки на источники, представленные в тексте диссертации.

Подводя итог рассмотрению диссертации И.Л.Шамрайчук, хотелось бы отметить, что эта работа является законченным научным исследованием и выполнена на высоком научно-методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, а сделанные на их основе выводы обоснованы. Основные результаты работы И.Л.Шамрайчук адекватно отражены в опубликованных печатных трудах. Автореферат диссертации полностью передает основное содержание диссертационной работы.

Таким образом, по объему полученного материала, глубине его анализа, достоверности и оригинальности полученных результатов и выводов, а также научной и практической значимости диссертационная работа И.Л. Шамрайчук отвечает требованиям установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.18 – «Микология» (по биологическим наукам и 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. Ее автор, Шамрайчук Ирина Леонидовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18 – Микология.

Официальный оппонент: главный научный сотрудник Института экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, д.б.н.

Домаш Валентина Иосифовна

Дата

Контактные данные: тел.: (+375 17) 284-16-60, e-mail: valdomash@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.00.04 — биохимия

Адрес места работы: 220072, г. Минск, Республика Беларусь, ул. Академическая,
27. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси

