

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу ГАВРЮШИНОЙ ИРИНЫ АЛЕКСАНДРОВНЫ
«Биологическая активность новых антимикробных пептидов -
эмерициллипсина и разработка биотехнологии их получения»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.6 – «Биотехнология»

Актуальность темы исследований. В современных условиях, когда у патогенных микроорганизмов стремительно нарастает устойчивость к широко применяемым противомикробным средствам, актуальным становится поиск и разработка технологий получения новых антибиотиков. Особенно востребованы препараты с противогрибным действием, среди которых особый интерес представляют антимикробные циклические пептиды – пептаиболы, обладающие рядом существенных преимуществ с точки зрения фармакологии.

Грибы являются неисчерпаемым источником новых биологически активных метаболитов, а экстремальные экосистемы предоставляют возможность изучения уникальных видов со своеобразным метаболизмом. Поэтому поиск продуцентов в экстремальных местообитаниях является крайне перспективным направлением.

В связи с этим выбор диссертанта упал на описанный совсем недавно сотрудниками кафедры микологии и альгологии биофака МГУ новый алкалофильный вид *Emericellopsis alkalina*, для штаммов которого была показана высокая активность в отношении условно-патогенных микроскопических грибов и выявлен новый пептаибол эмерициллипсин А (EmiA), а также близкие к нему виды рода *Emericellopsis*.

Научная новизна работы. Масштабных исследований способности образовывать и накапливать противогрибные соединения, в частности эмерициллипсины, на большой выборке культур у грибов рода *Emericellopsis* ранее не проводили. Впервые охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида из группы пептаиболов – эмерициллипсины Emi B-E, являющиеся структурными гомологами Emi A. Также выявлена новая активная дегидратированная форма Emi A (dEmi A),

Проведена оценка их антифунгальной активности на большой выборке тест культур условно-патогенных и клинических изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов, в том числе резистентных к применяемым в терапевтической практике препаратам. Для Emi A показана цитотоксическая активность на опухолевую линию клеток карциномы (НСТ116).

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате работы Гаврюшиной Ириной Александровной получены очень важные результаты. С теоретической точки зрения интересен вывод, что способность к образованию эмерициллипсина не является штаммоспецифичным признаком, профиль синтезируемых пептидов сходен у всех изученных изолятов *Emericellopsis alkalina*

Vilanenکو, выделенных из засоленных содовых почв, а у близкородственных видов отмечена дегидратированная форма эмерициллипсина. Следовательно, этот признак может быть значимым критерием для хемотаксономии видов рода *Emericellopsis*.

Важным практическим достижением является значительное пополнение коллекции культур микроорганизмов-продуцентов НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, полностью охарактеризованными штаммами продуцентами пептаиболов с антигрибной и цитотоксической активностью, которые могут быть использованы в научно-исследовательских и учебных целях.

Особенно ценно, что в работе разработан лабораторный регламент получения нового противогрибного пептида Emi A в условиях стационарного мембранно-жидкостного культивирования. Это значительный шаг к созданию методики промышленного получения нового препарата с действием в отношении клинических изолятов патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью.

Методы работы и оценка достоверности полученных результатов. Работа основана на результатах тщательной проработки большого объема материала. Для исследования из коллекции «Грибы экстремальных местообитаний» кафедры микологии и альгологии биологического факультета были отобраны 38 штаммов алкалофильных грибов рода *Emericellopsis*, вида *E. alkalina* и близкородственных, выделенные из щелочных засоленных почв различных географических регионов. Проведена верификация видовой принадлежности молекулярными методами.

Для культивирования использованы различные методы, позволяющие оптимизировать выход биотехнологического продукта. Отработаны наилучшие методы экстракции и детекции действующих веществ. Проведено определение их структуры и разностороннее изучение свойств современными аналитическими методами. Определен спектр антимикробной активности на расширенном наборе тест-организмов, включающим клинические штаммы с множественной лекарственной устойчивостью. Оценена цитотоксичность и гемолитическая активность изучаемых веществ.

В работе использованы как классические культуральные и морфологические исследования, так и современные подходы и методы анализа. Полученные результаты статистически обработаны и проанализированы с учетом работ других авторов. Таким образом, обоснованность научных положений и выводов, которые, безусловно, соответствуют проведенным исследованиям, не вызывает сомнений.

Общая характеристика работы. Рассматриваемая работа изложена на 182 страницах, содержит 11 таблиц, 23 рисунка и 2 приложения. Структурно диссертация состоит из введения, 3 глав основной части, заключения и выводов, списка использованной литературы и двух приложений, включающих филогенетическое дерево изолятов и лабораторный регламент на производство. Список литературы содержит 240 работ, в том числе 227 на иностранных языках.

Материалы диссертации были представлены на 7 международных и всероссийских конференциях, по результатам получен 1 патент и опубликовано 19

печатных работ, из них 5 статей 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 тщательному анализу современного состояния изучения антимикробных пептидов, их разнообразию, структурным особенностям и функции в природе, особое внимание уделено АМП с противогрибной активностью. Приведены сведения о ведущих базах данных по антимикробным пептидам. Описаны известные пептиды, синтезируемые грибами, их механизмы действия, методы выявления и производства.

Во второй главе «Материалы и методы» подробно изложены примененные методики культивирования и идентификации штаммов, выделения и определения структуры и активности метаболитов, а также статистической обработки данных.

Третья глава «Результаты исследований» посвящена изложению итогов работы и содержит 11 разделов, которые логично выстроены и представляют ход работы от анализа коллекции и отбора активных штаммов до разработки биотехнологии получения Emi A и характеристики безопасности предполагаемого препарата.

Завершает диссертационную работу заключение, где проведено обобщение результатов изучения антимикробных пептидов, образуемых коллекционными штаммами грибов *Emericellopsis alkalina* и близких видов и перспективы их практического внедрения как потенциальных лекарственных средств для клинической практики. Преимущество основного компонента Emi A состоит в том, что он практически не оказывает токсического действия на нормальные клеточные линии и не проявляет гемолитическую активность по отношению к эритроцитам человека, но демонстрирует цитотоксическую активность в отношении линии опухолевых клеток.

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

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

1) Первая задача работы: «провести исследование на наличие потенциальных продуцентов эмерициллипсидов среди коллекции штаммов (38 культур) алкалофильных грибов вида *Emericellopsis alkalina* и близкородственных видов *Emericellopsis* cf. *maritima* и *Emericellopsis* cf. *terricola*, изолированных из почв прибрежной зоны различных засоленных озер, изучить особенности накопления пептидов и структуру» по сути, содержит две задачи. Во-первых, – проанализировать коллекцию штаммов на способность к образованию АМП; во-

вторых, – изучить структуру выявленных пептидов. Целесообразно было бы не объединять это, а разбить на два пункта.

2) Второе выносимое на защиту положение сформулировано так: «Сформирована коллекция штаммов грибов алкалофильного рода *Emericellopsis* – продуцентов новых антимикробных пептидов эмерициллипсиров. Установлена структура для четырех новых Emi B-E, последовательности аминокислот в полипептидной цепи представляют собой гомологичные основному компоненту структуры с единичной заменой одной из аминокислот». Опять в одном положении объединены два разных этапа (работа с коллекцией штаммов и определение структуры антибиотического вещества). Формирование коллекции совсем не стоит выносить в защищаемые положения.

3) Небольшие неточности в обзоре литературы, так на стр. 25 в подписи к рисунку 1 указано, что база данных (APD; <http://aps.unmc.edu/AP>) содержит 3128 АМП со ссылкой на работу [Mahlapuu et al., 2020], а в тексте при описании этой же базы сказано, что «В базе данных антимикробных пептидов Antimicrobial Peptide Database насчитывается около 2700 видов АМП».

4) Есть незначительные несоответствия указания страниц в оглавлении (2.3.4 Идентификация штаммов грибов и филогенетический анализ – стр. 61, а не 60).

5) Недостаточно четко описана методика молекулярной идентификации и филогенетического анализа использованных штаммов. Из текста не ясно для каких штаммов проведена молекулярная идентификация в рамках данного исследования, а для каких было проведено ранее (только в результатах сказано, что «22 изолята были ранее отнесены к виду *E. alkalina*»). Существуют разногласия в количестве полученных и использованных в филогении последовательностей штаммов в тексте методов (стр. 61), результатов (стр. 77) и, собственно, на рисунке, отображающем филогенетическое дерево (стр. 144). В методах: «Чтобы проанализировать таксономию наших штаммов, была выполнена филогенетическая реконструкция, включающая 24 последовательности из штаммов *Emericellopsis* или типовых культур.» На дендрограмме – использовано 46 последовательностей, из них 16 отмечены как полученные в данном исследовании. Эти моменты стоило бы описать более детально, чтобы избежать вопросов, хотя очевидно, что идентификация полученных коллекционных культур не входила в задачи диссертационной работы.

Приведенные замечания носят формальный характер и не относятся к существу проведенной работы, они не могут снижать ее ценности и значения.

Работа в целом производит очень хорошее впечатление, хочется отметить большой объем материала обработанного и проанализированного, как классическими, так и современными методами, а также разностороннее исследование проблемы. Работа оформлена аккуратно, опечатки в тексте практически отсутствуют.

В заключение можно сказать, что диссертационная работа Гаврюшиной Ирины Александровны «Биологическая активность новых антимикробных пептидов

— эмерициллипсинов и разработка биотехнологии их получения» внесла существенный вклад в разработку новых биотехнологических препаратов для фармакологии и является законченной работой, которая по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, объему выполненных исследований соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Гаврюшина Ирина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических по специальности 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

02 февраля 2023 г.

Контактные данные:

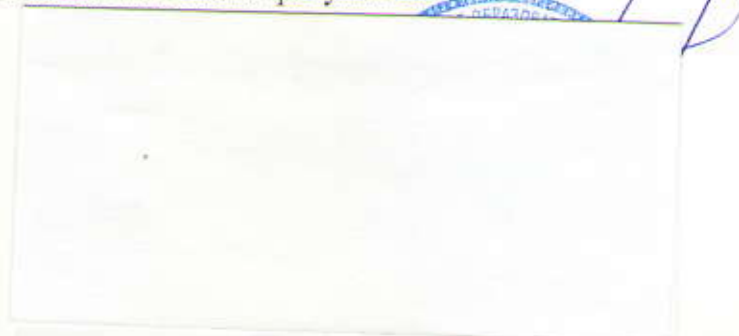
тел.: 8(495)939-27-64, e-mail: alexandrova@mail.bio.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.02.12 – «Микология» (биол. науки)

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет
Почтовый адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ, кафедра микологии и альгологии
Телефон: (495) 939-27-76
Факс: (495) 939-43-09
E-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись доктора биологических наук А.В. Александровой удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета МГУ



Е.В. Петрова