

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Фокичева Николая Сергеевича на соискание ученой степени кандидата биологических наук «ТРОМБОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *TOLYROSLADIUM*: СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ И СВОЙСТВА ПРОТЕИНАЗ» по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Актуальность:

Тромботические заболевания и тромбоэмболические осложнения составляют важнейшую медицинскую проблему. В Российских клинических рекомендациях по диагностике, лечению и профилактике венозных тромботических заболеваний (2019) указано, что повышение качества диагностики, лечения и профилактики тромбоза глубоких вен (ТГВ) и вторичных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) позволяет спасти жизнь тысяч людей, обеспечивает заметное снижение финансового давления на бюджет здравоохранения благодаря предотвращению тяжелых инвалидизирующих заболеваний. Одними из наиболее эффективных средств для борьбы с тромботическими осложнениями являются препараты – активаторы плазминогена. В настоящее время основой тромболитической терапии является фармакологический тромболитический активаторами плазминогена. С одной стороны, эта технология применяется достаточно широко для экстренной терапии при жизнеугрожающих инфаркте миокарда и ишемическом инсульте [XuX. , 2018, Liu, M., 2018, Donkel, S.J., 2019]. С другой стороны, общеизвестны геморрагические риски применения активаторов плазминогена и непредсказуемость их эффекта при системном введении в случае ТГВ. Гибридные технологии лечения острого венозного тромбоза тоже не исключили жизнеугрожающих состояний [Lu, Y., 2018, Badreldin, H.A., 2019]. Применение подобных лекарств в России (стрептокиназы, урокиназы, альтеплазы и их более современные аналоги) на данный момент значительно ограничено в связи с их достаточно высокой стоимостью и значительными рисками непереносимости: кровопотерей, возникновением разнообразных реакций гиперчувствительности организма и обширных кровоизлияний в жизненно-важные органы.

Инновационным подходом к решению проблемы терапии и диагностики тромбозов может стать использование лекарств, основанных на протеолитических

ферментах микромицетов. На сегодняшний день поиск и выделение новых метаболитов грибов, которые послужили бы основой для создания лекарственных препаратов, являются актуальными задачами медицинской биотехнологии и фармакологии. Стоит отметить, что одним из перспективных подходов к поиску таких продуцентов является скрининг среди экстремальных местообитаний, к которым относят морские глубины, засоленные грунты и другие источники. Предполагается, что антимикробные метаболиты психрофильных штаммов могут отличаться по своей структуре от синтезируемых мезофильными штаммами микроорганизмов. Так, психрофильные микромицеты могут оказаться неосвоенным, потенциально ценным источником новых продуцентов биологически активных соединений, в том числе ферментов.

Научная новизна:

Впервые изучен тромболитический потенциал семи штаммов микромицетов рода *Tolyposcladium*, выделенных из грунтов Белого моря. Показано наличие у них тромболитического потенциала, в сопоставлении с биотехнологическим и медицинским потенциалом ранее исследованного штамма микромицета *Tolyposcladium inflatum* k1, проведен отбор наиболее оптимального продуцента по показателям тромболитической эффективности (по значениям энзиматического индекса на диагностических средах с казеином, фибрином и фибриногеном, а также по степени эффективности протекания тромболизиса на модели фибринового тромба *in vitro*), и обладающего максимальной тромболитической активностью (фибринолитической и активаторной к плазминогену) в данной группе. Впервые для протеиназ штамма *Tolyposcladium inflatum* 62a автором показаны наличие выраженного пролонгированного во времени тромболитического эффекта в отношении лизиса фибринового геля, что свидетельствует о возможности его применения для разработки тромболитических лекарственных препаратов, в т.ч. комбинированных, с медленным клиренсом из кровотока, позволяя минимизировать затраты на количество вводимой субстанции, тем самым снижая стоимость препарата и геморрагические риски для пациента. Полученные данные также могут быть в дальнейшем использованы для разработки тромботерапевтических средств на основе препаратов микромицетов данной

группы, а также диагностических наборов (диагностикумов) на отдельные патологии системы гемостаза.

Теоретическая и практическая значимость работы: В результате проведенных исследований Фокичевым Николаем Сергеевичем получены важные для фармацевтической биотехнологии результаты. Среди микроскопических штаммов грибов рода *Tolyposcladium* выявлены и идентифицированы новые продуценты тромболитических ферментных препаратов, обладающие более выраженными тромболитическими свойствами, такими как фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность, степень эффективности тромболиза, специфичность в отношении отдельных белков системы гемостаза, а также отдельных белковых фракций, полученных после разделения методом изоэлектрофокусирования, по сравнению с ранее исследованными близкими аналогами (*Tolyposcladium inflatum* k1). Важным практическим достижением работы является создание коллекции штаммов, выделенных из грунтов Белого моря – новых продуцентов тромболитических препаратов для терапии и борьбы с тромботическими осложнениями, в том числе ангиопротекторов для наружного применения при лечении гематом, раневых повязок и создания диагностических наборов (диагностикумов) на отдельные патологии системы гемостаза.

Методология и методы исследований

В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических, биохимических, молекулярных и биоинформатических методов. Результаты исследований подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу. Результаты работы имеют значение для решения ряда фундаментальных и практических вопросов медицинской биотехнологии.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.

Структура диссертационной работы Фокичева Н.С. написана по традиционному принципу и состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение»,

«Заключение», «Выводы», и «Список литературы». Работа изложена на 172 страницах, содержит 56 рисунков и 14 таблиц. Список литературы включает 156 источников, в том числе 131 иностранных статей.

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, и 8 тезисов. Получен патент РФ № №2788697 «Способ оценки тромболитического потенциала микромицетов».

В главе 1 приводится обзор по теме исследования, где автор детально раскрывает функционирование системы гемостаза в норме и патологии, причины возникновения тромбозов, ферменты, участвующие в формировании тромбов и ферменты-тромболитики. Обзор хорошо иллюстрирован графически, приведены наглядные и простые к восприятию читателями схемы механизмов артериального и венозного тромбозов, процессов коагуляции и фибринолиза, отложений фибрина и др. Особое внимание автором отводится на современных терапевтических подходах, применяемых в тромботерапии, в обзоре подробно приводится классификации различных терапевтических средств и поколений тромболитических препаратов. Отдельная подглава посвящена обзору литературных и практических данных о роли микроскопических грибов как объектов для изучения их тромболитического потенциала и применения их в этих целях.

В главе 2 представлена исчерпывающая информация по объектам и материалам исследования, а также всех используемых автором в диссертационной работе методик, включающих классические и современные молекулярные микробиологические методы, а также блок химических исследований полученных соискателем ферментных препаратов.

Глава 3 разделена диссертантом на ряд подглав (3.1 – 3.3), согласно поставленным ранее задачам, и прекрасно иллюстрирована - во всех подглавах в качестве подтверждения имеется подробный материал, представленный в виде графиков и таблиц с результатами, полученными соискателем. Подглава 3.1. включает результаты молекулярно-генетической идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря, выявление протеолитического потенциала

штаммов, исследование экспериментальных образцов полученных из них тромболитических препаратов, полученных из штаммов-изолятов *Tolyposcladium*, включая определение их температурного и рН-оптимумов и динамику их накопления. Полученные соискателем данные свидетельствуют о широкой субстратной специфичности препарата протеиназ *T. inflatum* k1 и узкой, но более высокой специфичности отдельных фракций препарата после ИЭФ (№24, 28, 53) штаммов из Белого моря, т.к. они способны гидролизовать конкретные хромогенные пептидные субстраты протеиназ системы гемостаза. Отобран штамм *T. inflatum* 62а, из него тромболитические фракции, оптимум действия протеиназ препарата находится в пределах физиологических параметров крови человека (Т – 36,6°C, рН ~ 7,5). **Подглава 3.2** посвящена сравнительным исследованиям возможность применения препарата протеиназ микромицета *Tolyposcladium inflatum* 62а или его отдельных фракций для терапии тромботических состояний и диагностики патологий системы гемостаза определялась по сопоставлению тромболитических свойств с ближайшим аналогом штаммом *Tolyposcladium inflatum* k1, по оценке характера тромбодеструктивного эффекта, а также по возможным путям вывода препарата на рынок и биоэкономических моделей коммерциализации полученного штамма. В экспериментах по тромболизису препараты обоих штаммов микромицетов показали высокую эффективность при сходной удельной протеолитической активности. **Подглава 3.3** содержит результаты сопоставления свойств препаратов протеиназ и отдельных фракций микромицетов *Tolyposcladium inflatum* 62а и *Tolyposcladium inflatum* k1. Продемонстрированные препаратом штамма *T. inflatum* 62а фибринолитические и активаторные к плазминогену свойства могут найти применение для диагностики патологий системы гемостаза. Отдельно затрагиваются пути коммерциализации тромболитического препарата протеиназ *Tolyposcladium inflatum* 62а. Соискателем с соавторами получен патент в РФ на способ определения тромболитического потенциала микромицетов, подтверждающий высокий тромболитический потенциал предложенного штамма. Н.С. Фокичев приводит два возможных пути биоэкономической реализации этой разработки: первый – создание полноценного коммерческого тромболитического препарата активатора плазминогена на основе протеиназ микромицета *T. inflatum* 62а; второй – создание биомедицинской тест-

системы, готового диагностического набора (диагностикума) на возможные патологии системы гемостаза (в частности, на патологии компонентов системы свертывания, противосвертывания и фибринолиза), которая могла бы помочь в процессе своевременной постановки диагноза и ускорить начало лечения.

Автором в диссертационной работе представлено «**Заключение**», в котором обстоятельно систематизированы результаты диссертационной работы. **Выводы** сформулированы четко и обосновано, и полностью отражают представленный экспериментальный материал. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Несмотря на внушительный экспериментальный материал, целостность и масштабность проведенного исследования к работе есть несколько замечаний и вопросов:

1. Каковы будут потери основного вещества при выделении ферментного препарата, как будет оцениваться его чистота во фракциях и возможно ли выращивание продуцента на более дешевых питательных субстратах, чем приведенный в разделе 3.3.4 диссертации состав питательных сред с целью удешевления производства?
2. Чем можно обосновать температурный оптимум для исследованных ферментов, близкий к таковому у человека, если продуцент выделен из грунтов Белого моря, характеризующимися пониженными температурами?
3. В разделе объектов и методов нет четкого обоснования, почему в качестве контрольного продуцента для сравнения тромболитической активности был взят именно штамм - аналог *T. inflatum* k1, отсутствует его характеристика. Имеется лишь одна ссылка на описание этого продуцента (Шаркова и др., Приклад. биохимия и микробиология, 2016). Проводили ли сравнения с коммерческими препаратами, используемыми в клинике?

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует 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 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 Фокичев Николай Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, заместитель
директора по научной работе ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт по изысканию новых
антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Садыкова В. С.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.02.12 – Микология; 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Контактные данные: тел. +7(499) 255-20 -13 e-mail: sa

Адрес организации: 119021, Москва,

ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Отзыв Садыковой В.С. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИ-

