

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Фокичева Николая Сергеевича
на тему: «Тромболитическая активность микромицетов рода
Tolypocladium: скрининг продуцентов и свойства протеиназ»
по специальности 1.5.6. Биотехнология**

Работа Н.С. Фокичева имеет выраженную биотехнологическую направленность и посвящена исследованию биотехнологического потенциала препаратов протеиназ микромицетов рода *Tolypocladium*, выделенных из донных грунтов Белого моря. Протеиназы грибов применяются в различных областях народного хозяйства, например в кожевенной или пищевой промышленности, для удаления или частичного гидролиза белков. В данной работе сделана попытка оценить применение протеиназ грибов для медицинских целей – для тромботерапии и диагностики патологий системы гемостаза человека. Проблема тромбозов при различных патологиях сердечно-сосудистой системы в настоящее время дополняется последствиями Ковида 19 и других заболеваний, побочными эффектами которых являются образование тромбов. Существует три основных подхода для борьбы с образованием тромбов – использование антикоагулянтов, антиагрегантов и фибринолитиков. В данной работе исследовали фибринолитические свойства грибов, причем оценивая две активности – литическую в отношении фибрина и активаторную в отношении неактивного предшественника плазминогена для образования плазмина, обладающего высокой фибринолитической активностью. Основанием для работы служили проведенные ранее исследования для почвенного штамма гриба *Tolypocladium inflatum* k1, показавшие наличие фибринолитической активности в препарате протеиназ, что показало перспективность поиска продуцентов протеиназ среди грибов этого рода. Автор предложил оригинальный подход – поиск среди морских грибов, что открывает новые биотехнологические возможности, связанные с высокой соленостью ферментационных сред. Были исследованы семь изолятов грибов из морских грунтов Белого моря и у всех выявлена

фибринолитическая активность. Все вышесказанное убеждает в несомненной **актуальности** работы.

Обзор литературы включает 156 наименований работ в основном последних 15 лет и полностью отражает современные представления о системе гемостаза в норме и патологии (глава 1.1.), современных подходах к тромботерапии (глава 1.2.), и микромицетах, как перспективных продуцентах препаратов, эффективных в отношении тромботерапии и диагностики патологий системы гемостаза (глава 1.3.). В результате можно заключить, что автору свойствен аналитический подход, который широко и глубоко освещает проблему, что способствует дальнейшему восприятию экспериментального материала.

Работа выполнена на **высоком методическом уровне** с использованием современных микологических, биохимических и молекулярно-биологических методов анализа. В совокупности используемые методы и подходы, а также статистическая обработка результатов исследования не позволяют сомневаться **в достоверности полученных данных**. Нужно отметить прекрасные иллюстрации используемых методов, что улучшает их понимание.

Результаты исследований представлены в 3 главах: идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря (глава 3.1.), исследование тромболитических свойств ближайшего аналога микромицета-продуцента *Tolyposcladium inflatum* k1 (глава 3.2.), Тромболитический потенциал микромицета *Tolyposcladium inflatum* 62a для биотехнологического применения, терапии тромботических состояний и медицинской диагностики (глава 3.3.).

В работе выполнен большой объем работы, идентифицировано и исследовано 7 микромицетов, что дало возможность оценить разнообразие и выбрать наиболее активного продуцента. Первоначально была исследована скорость роста грибов при различных значениях температуры, pH и солености, что особенно важно для дальнейшей биотехнологической

работы. Особенно ценные результаты были получены при изучении динамики накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов, что дало возможность выбрать продуцент *Tolypocladium inflatum* 62a, у которого на 5-е сутки совпадали пики фибринолитической, активаторной к плазминогену и протеолитической активностей, при этом не происходило значительного снижения концентрации белка, как у других микромицетов. С использованием электрофореза была выявлена комплексность препарата и предпринято выделение наиболее активной фракции методом изоэлектрофокусирования, что позволило препаративно получить активную фракцию № 13. Важно, что был проведен сравнительный анализ протеиназ и их фракций у *T. inflatum* 62a и *T. inflatum* k1, что показало по всем показателям, что штамм *T. inflatum* 62a является биотехнологически более перспективным. Перечисленные **результаты следует считать приоритетными**, что и составляет безусловную **новизну, глубину и высокое биотехнологическое значение исследования.**

Работа является **целостным исследованием**, в котором идентифицированы 7 грибов, получены их ростовые характеристики, проведен анализ фибринолитической активности, представлены соображения по дальнейшему биотехнологическому масштабированию и продвижению препарата протеиназ из предложенного продуцента *T. inflatum* 62a, причем в двух направлениях – как лечебного препарата, так и для диагностических целей.

Таким образом, работа Н.С. Фокичева является **законченным исследованием с высокой практической и фундаментальной значимостью.** Выводы и выносимые на защиту положения хорошо обоснованы и экспериментально подтверждены. **Основные результаты работы полностью представлены** научной общественности в 11 научных работах, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, а также в устных и постерных сообщениях на конференциях.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе у меня нет, но, как и в каждой диссертации, в рецензируемой работе можно отметить некоторые недочеты:

1. В работе представлены результаты по влиянию солености на рост гриба и установлено, что оптимальные значения близки солености морской воды – 26%. И это указано в пункте 2 положений, выносимых на защиту. Почему для выращивания грибов с целью получения препарата протеиназ использованы ферментационные среды практически без соли?
2. Необходимо пояснить, почему были выбраны именно такие ферментационные среды и почему они не были уравнены по содержанию азота и углерода, что важно для сравнения.
3. В работе отсутствует микробиологическое описание особенностей роста грибов в поверхностной и глубинной культурах, спороношении грибов. Нет данных о накоплении биомассы в глубинной культуре, что является важным биотехнологическим показателем соотношения роста и продукции протеиназ.
4. При определении температурного оптимума роста выбран очень большой шаг – около 8°C, это может привести к неточности определения.
5. Полезно было бы указать, где на филогенетическом древе (рис. 32) находится референтный штамм *T. inflatum* k1. Почему на древе видовое значение *T. inflatum*, а в тексте (например в разделах 3.1.4., 3.2.5) встречается *T. inflatium*?
6. В разделе 3.1.6. приведены данные по определению оптимумов температуры и рН для активности препарата протеиназ. Возможно, стоило, как и для роста, определить оптимум по солености, что могло бы способствовать стабильности препарата, поскольку в

природных условиях действие экзогенных протеиназ происходит в морской воде.

7. На рис 50 для сравнения не хватает препарата протеиназ *T. inflatum* k1 на среде с глицерином. Для сравнения полезно было бы определить и динамику накопления препаратов протеиназ, как для штамма *T. inflatum* 62a.
8. Электрофорез показал, что препарат протеиназ гриба является комплексным, проводился ли электрофорез фракции 13? Проводились ли исследования по определению других активностей препарата протеиназ, например хитиназной, липазной и др.?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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,

ведущий научный сотрудник, руководитель группы экспериментальной

микологии ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные

основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт
микробиологии им. С.Н. Виноградского

Терёшина Вера Михайловна

27.02.2023



Контактные данные:

тел.: +7

ioh.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.07 – Микробиология

Адрес места работы:

117312, г. Москва, ул. просп. 60-летия Октября, 7, корп. 2.

Тел.: 7(9

Подпись сотрудника ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н.
Виноградского В.М. Терёшиной удостоверяю:

руководитель/кадровый работник



И.О. Фамилия

