

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Лавреновой Виктории Николаевны
на тему: «Воздействие протеолитических ферментов микромицетов
рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза»
по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия**

Работа В.Н. Лавреновой посвящена поиску протеаз грибного происхождения для тромботерапии. Проблема тромбозов при различных патологиях сердечно-сосудистой системы в настоящее время дополняется последствиями Ковида 19 и других заболеваний, побочными эффектами которых являются образование тромбов. Тромботические состояния, избыточное образование тромбов внутри сосудов, являются следствием дисбаланса прокоагулянтных и антикоагулянтных факторов. Существует три основных подхода для борьбы с образованием тромбов – использование антикоагулянтов, антиагрегантов и фибринолитиков. Многие используемые в медицинской практике антиагреганты и антикоагулянты имеют нежелательные побочные эффекты в виде кровотечений, что создаёт необходимость в разработке новых лекарственных препаратов и показывает высокую **актуальность** данного исследования.

Давно ведется поиск протеаз с фибринолитической активностью. Известны бактериальные протеазы с узкой специфичностью и грибные неспецифические, среди которых обнаружены перспективные протеазы с фибринолитической и активаторной к плазминогену активностями.

Автор ставит перед собой амбициозную задачу – найти продуцент с экзопротеазами, проявляющими одновременно фибринолитическую и антикоагулянтную активность, подобную человеческому протеину С.

Обзор литературы включает 256 наименований работ в основном последних 15 лет и полностью отражает современные представления о системе первичного и вторичного гемостазов, противосвертывающей системе человека в

норме и патологии (глава 1.1.), современных противосвертывающих и тромболитических препаратов (глава 1.2.), грибах-продуцентах фибринолитических и антикоагулянтных ферментов (глава 1.3.). В обзоре дан анализ современного состояния вопроса, он широко и глубоко освещает проблему, что способствует дальнейшему восприятию экспериментального материала.

Выполнен большой объем работы на **высоком методическом уровне** с использованием современных микологических и биохимических методов ферментного анализа. В совокупности используемые методы и подходы, а также статистическая обработка результатов исследования позволяют убедиться в **достоверности полученных данных**.

Результаты исследований представлены в 12 главах и их можно разделить на две части. Главы 3.1.-3.4. посвящены определению протеолитической активности при поверхностном и глубинном культивировании, амидолитической, фибринолитической и активаторной к плазминогену активностей 22 штаммов рода *Aspergillus*. На основании полученных результатов были разработаны критерии, позволившие выбрать перспективного продуцента – *Aspergillus tabacinus*. Главы 3.5. - 3.12. посвящены исследованию протеаз этого гриба – подбору оптимальных условий для максимального выхода ферментов, выделению и очистке ферментного препарата, электрофоретическому разделению протеаз и изучению их свойств – субстратной специфичности, стабильности и температурному оптимуму, их ингибиторов.

Нужно отметить важные для поиска протеаз результаты филогенетического анализа на основе 22 штаммов аспергиллов. Выявлено, что общей закономерностью для большинства штаммов являются фибринолитическая, прямая фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности, тогда как протеин С-подобная, фактор Ха-подобная и тромбиноподобная активности характерны для представителей серий *Versicolores* и *Speluncei* секции *Nidulantes* подрода *Nidulantes*. На основе этих результатов автором были сформулированы требования к препарату протеаз – антикоагулянтная активность наряду с тромболитической и специфичность к определённым субстратам системы гемостаза.

Особо ценным результатом исследования является впервые выявленная среди микроорганизмов внеклеточная негликозилированная протеаза *A. tabacinus* с протеин С-подобной активностью, способная расщеплять субстраты фактора Ха, тромбина, плазмина, урокиназы и тканевого активатора плазминогена. Проведенное исследование создало фундаментальные основы для последующей разработки способа получения перспективного ферментного препарата для тромботерапии.

Перечисленные **результаты следует считать приоритетными**, что и составляет безусловную **новизну, глубину и биотехнологическую перспективность исследования.**

Работа является **целостным исследованием**, в котором на примере 22 штаммов грибов рода *Aspergillus* проведен анализ фибринолитической активности, предложены критерии отбора перспективного продуцента, впервые выделена и частично очищена протеаза *A. tabacinus* с уникальными свойствами и изучены ее характеристики, позволяющие сделать вывод о ее перспективности для лечения тромбозов.

Таким образом, работа В.Н. Лавреновой является **законченным исследованием с высокой фундаментальной значимостью и перспективным биотехнологическим значением.** Выводы и выносимые на защиту положения хорошо **обоснованы и экспериментально подтверждены.** **Основные результаты работы представлены** научной общественности в 3 статьях 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 возникли некоторые замечания:

1. Неясно, по какому критерию были отобраны 22 штамма грибов для исследования.

2. Удивляет использование термина «экспрессия» к белкам, а не к генам. Например, «Протеомным анализом удалось идентифицировать экспрессию около 20 внеклеточных протеаз» (стр. 103) или на стр 14 «фактор V может экзоцитироваться; витамин K-зависимым ферментом, экспрессирующимся в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени» и др.
3. Видовые названия и таксономическая принадлежность должны быть указаны в соответствии с последним обновлением базы данных Index Fungorum. В табл 6 объекты исследования описаны не по правилам - без авторов. Отсутствуют номера в Генбанке. *A. penicilloides* по всему тексту написан с ошибкой (нужно *A. penicillioides*).
4. Стр 76 – не указан буфер для создания рН.
5. На рис. 8 нет обозначения фотографий.
6. На стр. 105 есть такая информация: «Штаммы, использованные в работе, являются ксерофильными непатогенными микромицетами». Однако ксерофильные грибы не растут при активности воды 1,0, их оптимум роста – при a_w 0,85 и ниже. Нужно пояснить, почему в работе использованы среды без учета их ксерофильности, или степень их ксерофильности детально не исследовалась?
7. Температурный оптимум протеазы *A. tabacinus* - 30-55°C, а диапазон температурной стабильности уже – 25-37°C. Как температурная нестабильность может повлиять на свойства препарата?
8. Непонятно, почему в автореферате не приведен список тезисов конференций.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия (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 Лавренова Виктория Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник, руководитель группы Экспериментальной микологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Терёшина Вера Михайловна

13.05.2024

Контактные данные:

тел.: +7 (495)135-01-69, e-mail: v.m.tereshina

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.07 – Микробиология

Адрес места работы:

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

info@fbras.ru Тел.: +7 (495) 954

Подпись сотрудника Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», В.М. Терёшиной удостоверяю:
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,

д.б.н. _____/А.Ф. Орловский/

13.05.2024