

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Макрушина Кирилла Валерьевича**
«L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Диссертационная работа К.В. Макрушина посвящена исследованию биосинтеза и свойств L-лизин- α -оксидазы, фермента, обладающего бактериостатическими, противопротозойными, противогрибковыми, противовирусными, антипролиферативными, противоопухолевыми свойствами. L-лизин- α -оксидаза является одним из ферментов, перспективных в энзимотерапии опухолей, основанной на разной чувствительности нормальных и опухолевых клеток к дефициту факторов роста, в том числе аминокислот. Грибы *Trichoderma* являются единственными известными в настоящее время продуцентами внеклеточных оксидаз L-аминокислот, в том числе и L-лизин- α -оксидазы. Данный факт предполагает использование различных штаммов, относящихся к роду *Trichoderma*, для создания более технологичной и экономичной схемы выделения данных ферментов. Способность к синтезу множества метаболитов, обеспечивающих *Trichoderma* высокий адаптационный потенциал в микроценозах почвы, лежит в основе использования этих грибов в качестве экологически безопасных биопестицидов в борьбе с инфекционными болезнями растений. На фоне изучения этих метаболитов, необходимых для контроля численности фитопатогенов, внеклеточная L-лизин- α -оксидаза интересна в рамках изучения ее физиологической роли в природном окружении, в том числе как возможного фактора биоконтроля. Однако в настоящее время недостаточно изучен механизм антимикробного действия этого фермента, ничего не известно об участии L-лизин- α -оксидаз из грибов *Trichoderma* в индукции системной устойчивости растений. Таким образом, исследование биосинтеза и свойств L-лизин- α -оксидаз грибов рода *Trichoderma* остается весьма актуальным вопросом, представляющим значительный интерес для микробиологии, биотехнологии и биомедицины. В связи с вышесказанным актуальность проблем, поставленных диссертантом, цели и задач вполне очевидна: получить гомогенный препарат L-лизин- α -оксидазы для медицинских исследований и показать возможную функциональную роль внеклеточной L-лизин- α -оксидазы.

На основании выполненных соискателем исследований:

найден активный штамм-продуцент L-лизин- α -оксидазы, выделенный из образцов лесной почвы (г. Пушкино, Московская область), идентифицированный как *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D;

подобраны субстрат и оптимальные условия для биосинтеза штаммом-продуцентом L-лизин- α -оксидазы, предложены 2 высокоэффективных метода ее выделения;

получен и охарактеризован гомогенный препарат с высокой удельной активностью (100 Е/мг белка), позволяющий его использование в медицинских исследованиях, и определены ферментативные свойства L-лизин- α -оксидазы;

показана высокая стабильность фермента: устойчивость при хранении, к действию детергентов, мочевины, протеаз и температуры;

выявлены факторы, предопределяющие функциональную роль L-лизин- α -оксидазы: показано, что процесс ее синтеза грибом *Trichoderma* сопровождается накоплением в ростовой среде пипеколиновой кислоты и H_2O_2 – элиситоров системной устойчивости растений;

определен механизм антимикробного действия фермента L-лизин- α -оксидазы как фактора конкуренции гриба *Trichoderma* с грамотрицательными и грамположительными

бактериями, а также фитопатогенными грибами, показано, что действие фермента обусловлено образованием экзогенного пероксида водорода, а также внутриклеточных активных форм кислорода.

Перечисленные результаты, несомненно, можно считать приоритетными, что свидетельствует о безусловной новизне исследования.

Анализ автореферата диссертации показал, что работа К.В. Макрушина выполнена на современном научно-методическом уровне. В работе использована оригинальная коллекция штаммов грибов, включающая 14 штаммов *Trichoderma* из ВКМ (ИБФМ РАН) и 8 штаммов-изолятов, выделенных из образцов почв поля и лесного массива г. Пушкино Московской области. Экспериментальные исследования проведены с использованием современных методов молекулярной биологии, микробиологии и биохимии на сертифицированном современном оборудовании. Спектр методов, использованных соискателем при выполнении работы, благоприятно отразился на глубине проработки намеченных задач. Семь основных выводов, приведенных в диссертации, обоснованы анализом достаточно большого объема достоверных экспериментальных данных. Положения, выносимые автором на защиту, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, аргументированы сравнением экспериментальных данных с результатами анализа литературы.

Результаты диссертационного исследования К.В. Макрушина прошли достаточную апробацию. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 4 статьи в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ».

Материалы работы были представлены и обсуждены на научно-практических конференциях различного уровня.

Полученная соискателем информация, несомненно, имеет перспективы для практического применения.

Разработан лабораторный регламент получения L-лизин- α -оксидазы с использованием отобранного в ходе выполнения работы активного штамма-продуцента. Полученный гомогенный препарат L-лизин- α -оксидазы проходит доклиническое исследование в ГОУ «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина.

Высокие активность и стабильность L-лизин- α -оксидазы, а также узкая субстратная специфичность и высокое сродство к лизину позволяют использовать препарата в медицинских исследованиях как перспективное лекарственное средство, в том числе терапии онкологических заболеваний. Кроме того, указанные свойства предполагают использование L-лизин- α -оксидазы в биоинженерии белков, а также для создания биохимических тестов для определения лизина.

Активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий позволит использовать выделенную L-лизин- α -оксидазу в качестве перспективного потенциального инструмента в разработке новых лекарственных средств против бактерий, резистентных к антибиотикам.

Результаты исследования дополняют сложившиеся представления о взаимоотношениях «растение – *Trichoderma* – патоген». Полученные в работе результаты могут быть использованы для разработки новых эффективных препаратов на основе грибов *Trichoderma* – активных продуцентов L-лизин- α -оксидазы - для защиты растений от фитопатогенов.

Результаты диссертационной работы К.В. Макрушина могут быть использованы в научных учреждениях биологического профиля, при подготовке курсов лекций по молекулярной биологии и микробиологии в высших учебных заведениях.

Научные положения и выводы диссертации К.В. Макрушина базируются на результатах собственных исследований автора, выполненных в соавторстве, что отражено в публикациях по теме диссертационной работы. Собственный вклад соискателя состоит также в его непосредственном участии в апробации результатов исследований на научных мероприятиях разного уровня, подготовке публикаций по выполненной работе. Следует отметить, что в двух из четырех статей в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК РФ, К.В. Макрушин является первым автором, что подчеркивает высокий уровень его личного участия в обработке и оформлении полученных данных.

В заключение анализа автореферата можно утверждать, что диссертация К.В. Макрушина представляет собой качественную и оригинальную работу как в научном, так и в прикладном аспектах.

Заключение

Диссертация **Макрушина Кирилла Валерьевича** «L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.03** – микробиология, является законченной научно-квалификационной работой и содержит решение научной проблемы, вносящей вклад в расширение существующих представлений о биосинтезе, свойствах L-лизин- α -оксидаз и перспективах использования этого фермента в биотехнологии и биомедицине. Использование и внедрение полученных новых данных и разработок внесет значительный вклад в развитие биологической отрасли знаний.

По актуальности, новизне и достоверности полученных результатов, обоснованности сделанных выводов, научной и научно-практической значимости работа «L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D» отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор этой работы, **Макрушин Кирилл Валерьевич**, заслуживает присуждения ему искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.03** – микробиология.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории генетики микроорганизмов
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук (ИБФРМ РАН)
доктор биологических наук
06 февраля 2019 г.

А.В. Шелудько

410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН
<http://ibppm.ru/>; раб. тел. (8452)97-04-44; e-mail: shel71@yandex.ru

Подпись А.В. Шелудько заверяю
Ученый секретарь
ИБФРМ РАН
06 февраля 2019 г.



О.Г. Селиванова