

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Макрушина Кирилла Валерьевича на тему «L-лизин- α -оксидаза гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.03 - микробиология»

Актуальность темы и практическая значимость работы

Несмотря на очевидные успехи в области разработки методов профилактики, диагностики и лечения, инфекционные болезни и злокачественные опухоли, по данным Всемирной организации здравоохранения, остаются в числе основных причин смертности населения. Возможности химиотерапии ограничены недостаточной эффективностью существующих лекарственных средств, побочными реакциями, возникающими на фоне их применения, а также развитием множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток. В связи с этим, поиск и разработка новых более эффективных препаратов, обладающих улучшенными химиотерапевтическими свойствами, является актуальной задачей (Diab Y., Muallem M.Z. *Anticancer Res.* 2017; Miyake H. et al. *Anticancer Res.* 2017; Yewale C., et al. *Biomaterials*, 2013).

Оксидазы L-аминокислот привлекают все большее внимание исследователей благодаря разнообразию их биологической активности. В частности, выявлены бактериостатические, противопротозойные, противогрибковые, противовирусные, антипролиферативные, противоопухолевые свойства этих ферментов, а также влияние на агрегацию тромбоцитов (Березов, 2005; Лукашева и др., 2012; Pollegioni *et al.*, 2013; Pokrovsky *et al.*, 2017).

L-лизин- α -оксидаза (ЛО) (E.C.1.4.3.14) – один из ферментов, перспективных в энзимотерапии опухолей, основанной на разной чувствительности нормальных и опухолевых клеток к дефициту факторов роста, в том числе, аминокислот (Березов, 2005). ЛО катализирует окислительное дезаминирование L-лизина с образованием аммиака, пероксида водорода и α -кетог- ϵ -аминокапроновой кислоты (Лукашева и др., 2002).

В обсуждаемой работе диссертантом Макрушиным Кириллом Валерьевичем описаны и полностью реализованы пути поиска и разработки новых биологически активных веществ: начиная от отбора штамма-продуцента лизин оксидазы, исследований свойств полученного ферментного препарата и, в дальнейшем, обоснование возможности его практического применения в медицине и сельскохозяйственной биотехнологии. С этой позиции актуальность и знаимость данного исследования выглядит несомненной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Целью работы Макрушина К.В. было выделить продуцент внеклеточной лизиноксидазы, определить его функциональную роль и получить гомогенный препарат

для медицинских исследований. В соответствии с поставленной целью решался ряд задач: выделить активный штамм-продуцент среди представителей грибов рода *Trichoderma*; определить оптимальные условия культивирования продуцента для синтеза фермента и метод его очистки; изучить основные ферментативные свойства ЛО, значимые для использования в медицине и его антимикробное действие.

Цель отличается конкретикой, а задачи сформулированы четко и затем успешно решены экспериментально. В работе продемонстрированы возможности современных микробиологических и биотехнологических методов, в том числе - моделирование отдельных этапов культивирования продуцента на ферментерах различного типа; биохимических, из которых отдельные методики очистки фермента отработаны впервые (автором модифицированы методы очистки ЛО, позволяющие получать высокий его выход). Макрушин К.В. для решения поставленных задач, использовал также комплекс физико-химических методов (электрофореза, гель-фильтрации, ЯМР - спектрометрии и др.), что указывает на многопрофильный профессиональный уровень подготовки диссертанта.

Результаты исследований подробно обработаны статистически, в том числе с применением методов математической статистики и теории вероятности. Полученные диссертантом выводы обоснованы и достоверны, опираются на анализ обширного экспериментального материала и существующую методологическую базу.

Результаты работы имеют значение для решения ряда теоретических вопросов медицинской микробиологии и сельскохозяйственной биотехнологии, однако в большей степени представляют практическую ценность и направлены на прикладное использование. Предложенные автором заключение и практические предложения делают реальным их использование для разработки новых эффективных препаратов на основе грибов *Trichoderma* - активных продуцентов ЛО – как для целей медицины (противоопухоловой терапии), так и для защиты растений от фитопатогенов и обеспечения высокой урожайности и хранения полученных сельскохозяйственных продуктов.

Оценка новизны и достоверности

Автором найден новый высокоактивный природный штамм-продуцент ЛО *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D, показан синтез ЛО в условиях роста *Trichoderma* на средах, содержащих семена культурных и диких злаковых растений. Впервые подобраны условия культивирования гриба, позволяющие получить высокий уровень выхода фермента ЛО (до 175 Е/г субстрата), что является максимальным уровнем

биосинтеза ЛО при любых типах ферментации грибов рода *Trichoderma*, согласно литературным данным.

Предложены два метода очистки фермента: один из них базируется на общепринятых (рутинных) подходах; второй – оригинальный метод, основанный на осаждении ЛО из культуральной жидкости солями Cu^{2+} . Оба метода позволяют получить гомогенный препарат ЛО с высокой активностью (100 Е/мг белка) и практическим выходом 60%. Впервые исследованы кинетические характеристики фермента ЛО, с учетом аллостерических эффектов.

Макрушиным К.В. выявлены факторы, предопределяющие возможную функциональную роль ЛО как участие во взаимоотношениях «Растение – *Trichoderma* – Фитопатоген». Показано, что биосинтез фермента сопровождается накоплением в среде роста пипеколиновой кислоты и пероксида водорода – элиситоров системной устойчивости растений. Важным и обладающим элементами новизны являются результаты по антимикробной активности и механизмам антимикробного действия ЛО с грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также фитопатогенными грибами.

Основными значимыми практическими результатами Макрушина К.В. являются разработка лабораторного регламента получения гомогенного препарата ЛО для лечения опухолевых заболеваний. Высокая активность и стабильность, а также узкая субстратная специфичность и сродство к лизину позволяют его использование в медицинских исследованиях как перспективное лекарственное средство в терапии рака. Полученный гомогенный препарат ЛО проходит доклиническое исследование в ГОУ «Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина.

Структура диссертации Макрушина К.В. построена по традиционному принципу и состоит введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы, включающего 235 ссылки и приложения. Текст работы занимает 131 страницу, содержит 36 рисунка и 18 таблиц.

Глава 1 (Литературный обзор) разбита по смыслу на две основные части. В первой части (1.1) дана краткая характеристика грибов рода *Trichoderma*, их применения в промышленности, в том числе для производства ферментов, биопрепаратов и других областях, в том числе как продуцентов ЛО. Вторая часть обзора (1.2) посвящена строению, физико-химическим свойствам, распространению в природе и функциональным свойствам фермента в живых организмах, механизму его действия, а

также применению этого фермента в медицине. Кроме того, подробно описаны различные способы получения лизин оксидазы и современные методы их очистки.

Глава 2 (Материалы и методы) посвящена описанию методов, применяемых соискателем для решения поставленной цели и задач. В главе 2 хотелось бы более подробное описание методических разделов «2.23. Анализ содержания аминокислот в среде роста *Trichoderma*» и «2.26. Определение пипеколиновой кислоты в культуральной жидкости». Кроме того, для раздела 2.23 было выбрано некорректное название «в среде роста», непонятно, что именно подразумевает под ним соискатель.

Глава 3 (Результаты и их обсуждение) разбита соискателем логически на ряд подразделов, согласно поставленным задачам исследования. В **подразделе 3.1 и 3.2** приводятся полученные автором подробные результаты по подбору условий культивирования, компонентов среды и различных субстратов, влиянии физико-химических факторов (температуры, аэрации, pH) на рост отобранного в результате многоступенчатого скрининга штамма-продуцента и его видовая идентификация. **Подраздел 3.3** посвящен оптимизации культивирования в ферментерах различного объема. Детальное исследование зависимости биосинтеза фермента от многочисленных разноплановых факторов позволило соискателю разработать оптимальные режимы культивирования и обеспечить высокий выход фермента 172 Е/г субстрата (12 Е/мл), как в колбах, так и при культивировании в ферментерах на 10 л. В литературе отсутствуют данные о получении такого высокого уровня биосинтеза ЛО при любых типах ферментаций.

Подраздел 3.4. Выделение и очистка ЛО – в данном подразделе диссертационной работы содержатся результаты выделения и очистки целевого фермента. Соискателем опробованы разные методы очистки и разработан оригинальный способ трехстадийной очистки ЛО с использованием метода осаждения фермента медь-имидазольным комплексом, получен гомогенный препарат фермента с удельной активностью, равной 100 Е/мг белка при степени очистки 250 раз и конечным выходом 65 %. По сравнению с традиционным осаждением сульфатом аммония, при данном подходе происходит уменьшение объема обрабатываемой жидкости (в 100 раз), уменьшение потерь активного фермента, а также сокращение числа стадий выделения (дробное высаливание фермента сульфатом аммония), что предполагает существенное снижение себестоимости продукта по сравнению с мировыми аналогами.

В подразделе 3.5 3.5. Физико-химические свойства ЛО приводятся результаты кинетических характеристик фермента с учетом аллостерических эффектов. Соискателем впервые были оценены коэффициент Хилла ($h = 2,03 \pm 0,14$) и константа Михаэлиса-

Ментен ($K_m=1,015 \cdot 10^{-5}$ М), величина которой показывает высокое сродство ЛО к лизину. Кроме того, показана зависимость активности фермента от диапазона рН и установлена его специфичность к различным субстратам. Выделенный соискателем ферментный препарат является высоко избирательным и абсолютно L-стереоспецифичным. Это позволяет предположить возможность его использования для создания биохимических тестов на L-лизин, а также в биоинженерии белков.

Подраздел 3.8 «Функциональная роль ЛО» - соискателем приводятся результаты исследования антагонистических свойств ферментного препарата в отношении грибов и бактерий. Особое внимание уделяется моделированию системы взаимоотношений продуцента с растением - хозяином. На примере накопления пипиколиновой кислоты, L – лизина и пероксида водорода в динамике разработана модель взаимоотношений "Растение - *Trichoderma* - Патоген" в природных условиях. Макрушиным К.В. показано, что в стрессовых условиях у гриба индуцируется синтез внеклеточных ЛО и протеолитических ферментов. Освобождающийся в результате действия протеаз L - лизин окисляется ЛО с образованием перекиси водорода и пипиколиновой кислоты, которые накапливаются в среде.

Автором в диссертационной работе представлено **«Заключение»**, в котором систематизированы результаты диссертационной работы. Показаны перспективы использования ЛО в различных областях, в том числе возможное использование фермента для создания биосенсоров, а также для разработки лекарственных средств активных к бактериям, резистентным к антибиотикам. **Выводы** сформулированы четко и обосновано и полностью отражают представленный экспериментальный материал.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Однако, несмотря на несомненные многочисленные достоинства работы и при общей положительной оценке диссертации Макрушина К.В. имеются следующие замечания и пожелания:

1. Одно из основных замечаний к диссертационной работе является использование устаревшей научной литературы. Это касается **главы 1 - обзора, раздела 1.1. «Грибы рода *Trichoderma*»**. Род *Trichoderma* является одним из самых изучаемых родов микромицетов, по нему практически ежегодно выпускаются большие обзорные статьи, есть несколько недавних монографий по экологии, особенностям физиологии и практическому использованию в биотехнологии (2015 - 2018 гг.), которые, к сожалению, никак не упомянуты соискателем.

2. В качестве замечаний восприятия текста “Главы 3 - результатов исследования” хотелось бы указать в первую очередь на слишком дробное разделение на подразделы и систематический отсыл к фактическому материалу в таблицах, приведенных ранее на несколько страниц по тексту, затрудняющее целостное восприятие результатов исследования. Кроме того, часто используется некорректная терминология «субстрат роста» и «среда роста». Как правило, в биотехнологии принято использовать термины “субстрат” и “питательная среда”.

3. При идентификации продуцента рода *Trichoderma* целесообразно было бы подтвердить его видовую принадлежность с помощью молекулярно-генетических методов. Для рода *Trichoderma* на настоящий момент описано и идентифицировано более 200 видов, и для многих, в том числе для изучаемого автором, *Trichoderma* cf. *aureoviride* в ряде работ ведущих мировых систематиков (И.А.Дружинина, Дж.Биссет, К. Кубичек) описана полифилетичность этого вида. Точное определение культуры - продуцента ЛО, с применением молекулярно-генетических методов, было бы интересно как с точки зрения метаболома вида, так и полезно для практики.

4. С.101 - Не очень понятно, с какой целью исследовалось содержание свободных аминокислот в среде при культивировании продуцента. Так же из таблицы 18 не ясно, что служило в качестве контроля и были ли определены данные аминокислоты в контроле (стерильная среда после автоклавирования без ферментации продуцента).

5. При описании в подразделе 3.8 на графическом материале отсутствуют данные о количественном содержании (нагрузке) вещества (ферментного препарата) на диск, что методически неверно. Для диско-диффузионного метода также есть четкие градации зон отсутствия роста тест-культур, определяющих уровень активности действующего вещества (“низкая - 10-15 мм”, “средняя - 15-20 мм” и высокая - более 25 мм” антибиотическая активность). На представленном графическом материале также не указаны какие-либо препараты сравнения.

Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации

Автореферат диссертации Макрушина К.В. целиком отражает ее содержание; в нем изложены основные положения работы. Основные результаты исследований обсуждались на нескольких Международных научных конференциях, симпозиумах и форумах, а также опубликованы в 19 научных трудах, в том числе, журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Заключение

Диссертация Макрушина Кирилла Валерьевича, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.03 –

микробиология», по актуальности темы, современному методическому уровню экспериментов, научной новизне и практической значимости результатов, объему выполненных исследований, в которых получены научно-обоснованные и статистически достоверные данные является законченной научно-квалификационной работой. В диссертационной работе содержится решения ряда прикладных научных задач, имеющих существенное значение для медицинской микробиологии и биотехнологии.

Работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее содержание - паспорту специальности «03.02.03 – микробиология».

По своей научной новизне и практической значимости выполненное диссертационное исследование соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г № 842, с изменением Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г № 335, а ее автор - Макрушин Кирилл Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.03 – микробиология».

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.

Отзыв Садыковой В.С. заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ «НИИНА», ^{И.С.Х.Н.}



О.В. Кисиль

«11» сентября 2019 года

Адрес организации: 119021, Москва,
ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1
тел. 89263110325, e-mail: sadykova_09@mail.ru