

ОТЗЫВ  
официального оппонента на диссертацию  
**Графской Екатерины Николаевны**  
**«АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ КЛЕТОК**  
**МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS*»,**  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.01.04 – биохимия

**Актуальность темы исследования**

Хорошо известно, что поиск новых биологически активных соединений, обладающих антимикробной активностью, является одним приоритетных направлений комплексного научного исследования, что на официальном уровне находит свое отражение в Перечне Стратегий научно-технологического развития Российской Федерации сразу по двум направлениям: Н3 «переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)» и Н4 «переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработку и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективную переработку сельскохозяйственной продукции». Одной из основополагающих причин обозначенной актуальности является преодоление факторов, приводящих к возрастанию резистентности к уже применяемым в медицине и сельском хозяйстве противомикробным препаратам, которые негативным образом воздействуют на эффективность такой терапии и приводят в ряде случаев к достаточно серьезным последствиям. В этой связи природные антимикробные пептиды (АМП), являясь факторами врожденного иммунитета многих организмов, представляют собой достаточно привлекательную кандидатную группу новых противомикробных соединений за счет, главным образом, молекулярной природной эволюционной адаптации в направлении преодоления индуцированной резистентности патогенных микроорганизмов. Стоит также отметить, что существует большое разнообразие живых организмов – природных источников АМП, преимущественно среди беспозвоночных и микроорганизмов. Однако в последнее время среди этого многообразия часто выбирают тех из них, пептидом которых обладает широким спектром функциональной активности, в частности, за счет особенностей биологии и экологии целевого организма. В связи с этим, заявленный автором диссертационного исследования вид – медицинская пиявка (*Hirudo medicinalis*) является наглядным примером такого организма, поскольку так называемая антимикробная составляющая может быть тесным образом ассоциирована с различными активностями, показанными ранее.

**Степень обоснованности научных положений и достоверности полученных результатов**

Стоит отметить, что представленные в работе научные положения, выносимые на защиту, а также выводы, в полной мере обоснованы применением широкого спектра используемых современных физико-химических и микробиологических методов, которые обеспечивают корректность и достоверность полученных экспериментальных результатов. В данной работе был применен методический комплекс, включающий в себя ряд аналитических (спектроскопия ядерного магнитного резонанса, жидкостная хроматография/масс-спектрометрия), функциональных (определение антибактериальной, цитотоксической и гемолитической активности) методов вместе с компьютерными подходами анализа данных высокопроизводительного секвенирования генома и

разнообразными предсказательными алгоритмами, которые позволили выполнить данное исследование на мировом уровне, что подтверждается наличием публикаций в ряде рецензируемых рейтинговых научных изданиях, а также аprobацией посредством участия в большом количестве российских и зарубежных научных конференций. Таким образом, заявленные в настоящей диссертационной работе положения и выводы можно считать в полной мере обоснованными.

### **Научная новизна**

В рамках данного исследования автором была установлена последовательность генома медицинской пиявки (*H. medicinalis*) с последующим проведением его аннотации, что послужило основой для проведения в дальнейшем поиска АМП с применением соответствующих алгоритмов. Немаловажным моментом также является выполнение работ по анализу протеома секрета слюнных клеток данного вида, с его детальной аннотацией и систематизацией функционально значимых полипептидов. Осуществленный поиск АМП с использованием предсказательных алгоритмов лег в основу их получения в форме синтетических аналогов и экспериментального подтверждения биологической активности. Использование аналитических методов позволило идентифицировать третичные структуры для выборочных АМП, сравнить их с результатами предсказательных алгоритмов, а также изучить их функциональность на молекулярном уровне посредством связывания с искусственными мембранами различного липидного состава и определить селективность.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Основная практическая значимость данной работы заключается в существенном расширении имеющихся знаний о функциональном белково-пептидном составе природного происхождения и создании соответствующей базы данных, которая может быть использована в качестве источника информации для разработки новых лекарственных соединений, в частности, с антимикробными свойствами. С теоретической точки зрения, полученные данные позволяют в будущем достичь большей степени понимания вероятной взаимосвязи между белковыми и пептидными молекулами – факторами реализации различных типов активности в составе секрета, выделяемого медицинской пиявкой (*H. medicinalis*).

### **Соответствие диссертации и автореферата требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней**

Содержание диссертации, её актуальность, научная новизна, практическая значимость и выводы, автореферат и представленные публикации в должной степени соответствуют Положению о порядке присуждения ученых степеней ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в части, касающейся присвоения ученой степени кандидата биологических наук.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 119 страницах печатного текста, состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение результатов», а также разделов: «Заключение», «Выходы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы», «Благодарности» и «Приложения». Работа также содержит 16 таблиц, 24 рисунка, список цитируемых источников насчитывает 293 ссылки исключительно зарубежных научных изданий.

## **Личный вклад автора**

Автором проведен поиск и систематизация источников научной литературы по теме диссертационного исследования, участие в планировании экспериментальной работы и написании статей. Непосредственное практическое достижение докторанта – это оптимизация биоинформационного алгоритм анализа генома пиявки медицинской (*H. medicinalis*) с целью поиска и идентификации АМП с определенными физико-химическими свойствами, проведение работ по тестированию синтетических АМП на антибактериальную и гемолитическую активности, а также механизма мембранны-активного действия данных молекул. Стоит отметить, что данная диссертация во многом является самостоятельным трудом автора.

## **Замечания и вопросы по работе**

1. Раздел «Цели и задачи», пункт 4 (стр. 5 диссертации) – автор говорит об изучении вторичной структуры активных АМП методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Настоящий метод структурного анализа используется, в первую очередь, для определения пространственной структуры полипептидов, а элементы вторичной структуры – как неотъемлемый фактор формирования третичной. Возможно, более корректно было бы заменить понятие «вторичная» на «пространственная» структура?!
2. Раздел «Положения, выносимые на защиту», пункт 2 (стр. 7 диссертации) – фраза «...биоинформационный алгоритм идентификации АМП в геноме, нацеленный на поиск последовательностей, кодирующих короткие положительно заряженные пептиды с тенденцией к образованию альфа-спиральных структур...» - по какой причине изначально в работе был сделан упор именно на АМП с данным типом структуры? Хорошо известно, что спектр АМП беспозвоночных включает в себя в достаточной степени широкое структурное разнообразие полипептидов с данной функцией, в частности, дисульфид-связанных.
3. Тот же раздел: при описании свойств АМП складывается впечатление, что понятие «анти микробный» полностью эквивалентно термину «антибактериальный», что не в полной мере корректно. В литературном обзоре не приведено информации касательно антрафунгальных свойств рассматриваемых АМП.
4. Раздел 1.3. «Механизмы действия антимикробных пептидов» (стр. 20 диссертации) – в тексте приводится не так много примеров так называемого противоракового действия АМП. Приведите, пожалуйста, больше примеров противоопухолевой (цитотоксической, антипролиферативной) активности АМП различного природного происхождения.
5. Подраздел 1.4.3 «Базы данных антимикробных пептидов» (стр. 26 диссертации) – автор пишет о преобладании в базах данных АМП млекопитающих, амфибий, насекомых и говорит о том, что в них практически отсутствует информация об АМП червей. Насколько велико разнообразие видов червей как объектов для анализа природных функционально значимых полипептидов? И какая ситуация в данном аспекте с одним из модельных организмов – свободноживущей нематодой *Caenorhabditis elegans*?
6. Подраздел 2.2.6 «Выделение секрета слюнных клеток *H. medicinalis*» (стр. 43 диссертации) – фраза «Собранные образцы концентрировали на твердофазном экстракционном картридже Sep-Pak Vac C18...» - не может ли приводить такой тип концентрирования тотального экстракта к потере части высокомолекулярных белков и гидрофобных полипептидов за счет их необратимой сорбции на неподвижной фазе? Для этой цели более правильно было бы использование обращенной фазы C8.

7. Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ. Раздел 3.1. «Определение полной нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis*» (стр. 57 диссертации) – В излагаемых результатах речь идет о наличии так называемой прокариотической контаминации в геноме исследуемого организма (4094 против 29764 контига собственно для *H. medicinalis*). Хотелось бы понять, как можно объяснить такое значительное присутствие чужеродной ДНК (около 14%) и проводился ли метагеномный анализ прокариот, в частности, на предмет ассоциации с онтогенезом самой пиявки?
8. Раздел 3.2. «Аннотация генома *H. medicinalis*» (стр. 58-59 диссертации) – в рамках обсуждения автором было выполнено сравнение генома *H. medicinalis* с известными геномами гематофагов (пиявок других видов, постельного и иксодового клещей, комара). Однако вызывает вопрос, по какой причине в данную подборку, во-первых, включена летучая мышь (*Myotis lucifugus*), которая не питается кровью, а, во-вторых, добавлены представители спирально-дробящихся беспозвоночных, которые по своей биоэкологии в целом далеки от пиявок.
9. Раздел 3.4. «Известные антимикробные пептиды *H. medicinalis*» (стр. 63 диссертации) – среди спектра известных АМП, представленных в работе, не фигурируют представители группы дефензинов – базовых молекул врожденного иммунитета. Проводился ли целенаправленный поиск таких молекул и что можно сказать об их представленности в геномах пиявок рода *Hirudo*?
10. Тот же раздел (стр. 65 диссертации) - таблица 6 «Кандидатные антимикробные пептиды, идентифицированные при анализе нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis*» - все ли данные пептиды являются предсказанными? То есть, транслированными с нуклеотидных последовательностей в аминокислотные? Удалось ли в процессе протеомного анализа выявить измеренные молекулярные массы, совпадающие с расчетными, которые приведены в таблице?! Дело в том, что для целого ряда природных линейных АМП беспозвоночных свойственно наличие С-концевого амидирования (аналогично с вопросом из пункта 7), которое, во-первых, стабилизирует спиральную конформацию пептида, а, во-вторых, повышает количественный уровень биологической активности.
11. Раздел 3.9. «Взаимодействие антимикробных пептидов с липосомами» (стр. 77 диссертации) – фраза «Пептиды 3967 и 536\_1 проявляют зависимую от концентрации повреждающую активность в отношении везикул с анионными (ДОФГ, ПОФС), но не взаимодействуют с цвиттерионными везикулами (чистый ПОФХ), которые моделируют мембрану эукариотических клеток» - приведите, пожалуйста, ссылки на работы, в которых ПОФХ используется как единственный (или по крайней мере преобладающий) компонент мембран эукариотических клеток (и кстати каких именно)?

## Заключение

В заключении необходимо отметить, что приведенные замечания и комментарии не снижают научный уровень и практическую значимость рецензируемой диссертации. Рукопись изложена достаточно грамотным языком, характерным для работ в области естественных наук. Автореферат и опубликованные статьи в полной мере отражают содержание диссертационного исследования. Актуальность темы, степень обоснованности выводов и научных положений данной работы, а также достоверность и бесспорная новизна экспериментальных результатов позволяют заключить, что диссертация Графской Екатерины Николаевны **«АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ КЛЕТОК МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS*»** представляет собой полностью законченную научно-квалификационную работу, в которой фигурируют результаты, имеющие, в частности, важное практическое значение в области

целенаправленного поиска новых противомикробных соединений для медицины и ветеринарии.

Настоящая работа в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым ВАК Министерства науки и высшего образования РФ к кандидатским диссертациям, а её автор **Графская Екатерина Николаевна** заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Старший научный сотрудник лаборатории  
нейрорецепторов и нейрорегуляторов  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН),  
кандидат химических наук по специальности  
02.00.10 – «биоорганическая химия»,

/Рогожин Евгений Александрович/

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; e-mail: office@ibch.ru;  
тел.: +7 (495) 335-01-00

**Подпись к.х.н. Рогожина Е.А. заверяю:**

Ученый секретарь  
Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН),  
доктор физико-математических наук,



/Олейников Владимир Александрович/

«28» МАЯ 2021 г.