

Заключение диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01), созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 23 сентября 2021 г. № 7

О присуждении Графской Екатерине Николаевне, гражданке РФ, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Антимикробные пептиды секрета слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*», по специальности 1.5.4. (03.01.04) – биохимия принята к защите 25 марта 2021 г., протокол № 4, диссертационным советом Д 001.010.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения (ФГБНУ) «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, созданного Приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012 г. с внесением изменений Приказом Минобрнауки России № 791/нк от 09.12.2020 г. и Приказом Минобрнауки России № 561/нк от 03 июня 2021 г.

Соискатель Графская Екатерина Николаевна, 1992 года рождения.

В 2015 году соискатель окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждения высшего профессионального образования (ФГАОУ ВПО) «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)». В 2019 году окончила очную аспирантуру при ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)». Работает лаборантом в лаборатории генной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения (ФГБУ) «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России).

Диссертация выполнена в лаборатории генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.

Научный руководитель – доктор биологических наук, доцент Лазарев Василий Николаевич, заведующий отделом клеточной биологии, заведующий лабораторией генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России.

Официальные оппоненты:

Шмаров Максим Михайлович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии;

Рогожин Евгений Александрович, кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН), научный сотрудник лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки (ФГБУН) Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, гор. Москва, в своём положительном заключении, подписанным Свешниковой Анастасией Никитичной, доктором физико-математических наук, заведующей лабораторией внутриклеточной сигнализации и системной биологии, отметила некоторые опечатки, несогласованные предложения и утверждения, не поддержанные ссылками на литературу, неточности в обзоре литературы и обсуждении результатов при описании антикоагулянтного и антиагрегатного действия сокрета слюнных клеток; кроме того, неясно, как проводился учет потенциальных посттрансляционных модификаций пептидов, какие критерии использовались для выбора оптимального биоинформационического алгоритма. Однако принципиальных замечаний по содержанию диссертации, результатам и

сформулированным выводам не имеется. Работа является законченным научно-исследовательским трудом и выполнена на высоком методическом уровне.

Соискатель имеет 28 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 26 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях - 5.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Grafskaia E.N. The *Hirudo medicinalis* microbiome is a source of new antimicrobial peptides / E.N. Grafskaia, E.R. Pavlova, V.V. Babenko, I.A. Latsis, M.V. Malakhova, V.N. Lavrenova, P.V. Bashkirov, D.M. Belousov, D.V. Klinov, V.N. Lazarev // International Journal of Molecular Sciences. - 2020. - Т. 21, № 19. - С. 1–14. ИФ – 4,556 (WoS). Объем статьи 1,62 п.л. Данная работа посвящена поиску и исследованию свойств новых антимикробных пептидов (АМП) метагенома медицинской пиявки *H. medicinalis*. Соискатель анализировал метагеномные данные, проводил эксперименты по оценке антимикробной активности пептидов, изучению пространственной структуры пептидов методом кругового диахроизма, писал статью, а также работал с текстом на всех этапах её рецензирования.
2. Babenko V.V. Draft genome sequences of *Hirudo medicinalis* and salivary transcriptome of three closely related medicinal leeches / V.V. Babenko, O.V. Podgorny, V.A. Manuvera, A.S. Kasianov, A.I. Manolov, E.N. Grafskaia, D.A. Shirokov, A.S. Kurdyumov, D.V. Vinogradov, A.S. Nikitina, S.I. Kovalchuk, N.A. Anikanov, I.O. Butenko, O.V. Pobeguts, D.S. Matyushkina, D.V. Rakitina, E.S. Kostryukova, V.G. Zgoda, I.P. Baskova, V.M. Trukhan, M.S. Gelfand, V.M. Govorun, H.B. Schiöth, V.N. Lazarev // BMC Genomics. - 2020. - Т. 21., № 331. - С. 357681. ИФ – 3,594 (WoS). Объем статьи 1,85 п.л. В работе впервые получен, проаннотирован и проанализирован геном медицинской пиявки *H. medicinalis*, описана идентификация новых белков секрета слюнных клеток *H. medicinalis*, исследованы транскриптомы медицинских пиявок *H. medicinalis*, *H. verbana* и *H. orientalis*. Графская Е.Н. анализировала геномные и транскриптомные данные, участвовала в подготовке результатов работы к публикации.

3. Grafksaia E.N. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens / E.N. Grafksaia, K.D. Nadezhdin, I.A. Talyzina, N.F. Polina, O.V. Podgorny, E.R. Pavlova, P.V. Bashkirov, D.D. Kharlampieva, P.A. Bobrovsky, I.A. Latsis, V.A. Manuvera, V.V. Babenko, V.M. Trukhan, A.S. Arseniev, D.V. Klinov, V.N. Lazarev // European Journal of Medicinal Chemistry. - 2019. - Т. 180. - С. 143–153. ИФ – 5,553 (WoS). Объем статьи 1,27 п.л. В статье продемонстрировано использование биоинформационического подхода для анализа генома медицинской пиявки *H. medicinalis* с целью поиска новых антимикробных пептидов. В результате исследования обнаружен ряд новых АМП, обладающих антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и низкой цитотоксичностью. Соискатель анализировал геномные данные, проводил эксперименты по оценке антимикробной и гемолитической активности пептидов, изучению функциональных свойств пептидов, обрабатывал результаты, а также писал статью и работал с текстом на всех этапах её рецензирования.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

официального оппонента Шмарова Максима Михайловича, доктора биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии, в котором отмечены некоторые замечания. Так, в отличие от антимикробной активности гемолитическая и цитотоксическая активности измерены не для всех кандидатных пептидов *H. medicinalis*, не во всех экспериментах проведено сравнение активности обнаруженных пептидов с известным антимикробным пептидом – мелиттином. Если бы антимикробную и цитотоксическую активности пептидов исследовали в экспериментах *in vivo*, то предположения о практическом применении обнаруженных в работе антимикробных пептидов

были бы более обоснованными. Однако, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

официального оппонента Рогожина Евгения Александровича, кандидата химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН), научный сотрудник лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов, в котором отмечены некоторые замечания, поставлен ряд вопросов, а также представлены комментарии по ряду проблем, рассматриваемых в работе. К числу замечаний по разделу «Цели и задачи» относится фраза автора об изучении вторичной структуры активных АМП методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Возможно, более корректно было бы заменить понятие «вторичная» на «пространственная» структура, поскольку настоящий метод структурного анализа используется, в первую очередь, для определения пространственной структуры полипептидов. При описании свойств АМП складывается впечатление, что понятие «антимикробный» полностью эквивалентно термину «антибактериальный», что не совсем корректно. В обзоре литературы не приведена информация о противогрибковых свойствах рассматриваемых АМП. Однако приведенные замечания и комментарии не снижают научный уровень и практическую значимость рецензируемой диссертации.

В положительном отзыве на автореферат Ильясова Игоря Равилевича, кандидата фармацевтических наук, Институт фармации им. А.П. Нелюбова ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), доцент кафедры химии, замечаний нет.

В положительном отзыве на автореферат Мурашовой Натальи Михайловны, кандидата химических наук, ФГБУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», доцент кафедры наноматериалов и нанотехнологии, отмечается отсутствие в автореферате описания экспериментов и методов, используемых в работе, а также указано на

предпочтительное изменение формы кривых на рисунке 5. Однако эти замечания носят частный характер и не снижают значимость и ценность проведенной работы и полученных результатов.

В положительном отзыве на автореферат Нефёдовой Виктории Викторовны, кандидата биологических наук, ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», научный сотрудник лаборатории биохимии белка, отмечается, что исследование гемолитической и цитотоксической активности антимикробных пептидов представляется неполным, поскольку интересно было бы проверить цитотокическое действие этих пептидов в отношении других типов клеток, в частности эпителиальных или иммунных, с которыми антимикробные пептиды могли бы контактировать в качестве терапевтических агентов; также поставлен вопрос относительно возможной связи между вторичной структурой пептидов и их антимикробной, гемолитической и цитотоксической активностью. Однако эти замечания никак не умаляют значимости и высокого уровня выполненной работы.

В положительном отзыве на автореферат Дашинимаева Эрдэма Баировича, кандидата биологических наук, ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Центр высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины, старший научный сотрудник, в качестве критического замечания отмечается, что в ряде экспериментов при оценке цитотокического действия пептидов отсутствуют данные для положительного контроля – мелиттина, который использовался в работе в других экспериментах.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован тем, что доктор биологических наук Шмаров Максим Михайлович является видным специалистом в области молекулярной биотехнологии, в сфере научных интересов которого антимикробные пептиды занимают далеко не последнее место; кандидат химических наук Рогожин Евгений Александрович является

ведущим специалистом в области структурно-функционального анализа антимикробных пептидов различных биологических объектов.

Выбор ведущей организации объясняется тем, что ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН представляет крупное научное учреждение, проводящее фундаментальные и прикладные исследования, в которых, в том числе, сочетаются современные методы компьютерной системной биологии и математической физиологии, с многоуровневыми экспериментальными подходами изучения механизмов фармакологического действия лекарственных средств.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- впервые определена и аннотирована нуклеотидная последовательность генома *H. medicinalis*;
- впервые проанализирован протеом нативного секрета слюнных клеток *H. medicinalis*
- обнаружены и описаны новые пептиды *H. medicinalis*, обладающие антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, низкой гемолитической активностью и не проявляющие цитотоксичности по отношению к клеткам млекопитающих;
- впервые методом ЯМР-спектроскопии продемонстрировано, что обнаруженные антимикробные пептиды принимают а-спиральную конформацию в мембранном окружении;
- изучен механизм антимикробного действия новых пептидов, который включает дезинтеграцию клеточной мембраны бактерий.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что полученные в работе результаты позволяют расширить имеющиеся знания о функциональном белково-пептидном составе секрета слюнных клеток медицинской пиявки *H. medicinalis*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что новые АМП в дальнейшем могут рассматриваться

в качестве потенциальных антибактериальных препаратов. Биоинформационный алгоритм для анализа геномных данных с целью поиска новых АМП может быть применён для поиска АМП в других организмах.

Оценка достоверности результатов исследования подтверждается использованием самой передовой материально-технической базы, а также опубликованием результатов в высокорейтинговых журналах с серьезным уровнем рецензирования статей.

Личный вклад соискателя заключался в поиске и анализе научной литературы по теме исследования, участии в планировании экспериментов, оптимизации биоинформационного алгоритма анализа нуклеотидной последовательности генома *H. medicinalis* для идентификации АМП, анализе биологической активности и механизме действия АМП, а также в интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания: 1) приведенное в работе определение «антифунгальные» свойства следовало бы заменить употребляемым в русском языке термином «противогрибковые» свойства; 2) приведенное в работе понятие « противоопухолевые свойства» пептидов следовало бы заменить понятием цитотоксичность пептидов при работе с клетками.

Соискатель Графская Е.Н. согласилась с замечаниями.

На заседании 23 сентября 2021 г. диссертационный совет принял решение за идентификацию и изучение antimикробных пептидов секрета слюнных клеток *H. medicinalis*, представляющих собой новые белки, которые могут послужить основой для разработки новых лекарственных препаратов, присудить Графской Екатерине Николаевне учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 12 докторов наук по специальности 1.5.4. (03.01.04) – «биохимия», участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в

состав совета, проголосовали: за - 19, против - нет, недействительных бюллетеней - 1.

Зам. председателя Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор



Медведев А.Е.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

23 сентября 2021 года

