

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
Элпидиной Елены Николаевны
на диссертационную работу Барашковой Анны Сергеевны
«Изучение структурного разнообразия и биологической активности защитных
пептидов из семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.)»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия

Актуальность исследования

Защитные пептиды растений (антимикробные пептиды, АМП) являются важными компонентами врожденного иммунитета и представляют собой перспективную основу для создания новых противомикробных препаратов для медицины и ветеринарии, биоконсервантов для нужд пищевой промышленности, а также инновационных средств защиты сельскохозяйственных культур от болезней. Нигелла посевная (*Nigella sativa* L.) известна в народной и официальной медицине благодаря широкому спектру фармакологических эффектов, которые обусловлены преимущественно наличием в её семенах спектра вторичных метаболитов, самым известным из которых является тимохинон. Однако глубокого систематического анализа разнообразия макромолекул, в частности, белков и пептидов, входящих в состав ее семян до недавнего времени не проводилось.

Диссертационная работа А.С. Барашковой посвящена исследованию разнообразия антимикробных пептидов семян *N. sativa*. В ходе работы были выделены и охарактеризованы новые эффекторные пептиды, определены их первичные структуры, спектр биологической активности и подходы к механизму действия. Работа актуальна как для фундаментальной науки (расширение представлений о структурном разнообразии растительных АМП), так и для прикладных областей, связанных с поиском альтернативных антибиотиков в условиях роста антимикробной резистентности.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав «Объекты и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», выводов и списка цитированной литературы (включающего 372 наименования). Работа иллюстрирована 45 рисунками и 16 таблицами, оформление соответствует требованиям ВАК.

Научная новизна и практическая значимость

В диссертационной работе А.С. Барашковой впервые проведено систематическое исследование комплекса защитных пептидов семян *N. sativa* с использованием оптимизированной схемы выделения. Благодаря этому охарактеризовано 15 индивидуальных пептидов, из которых 10 являются новыми. Впервые из семян растения выделено большое семейство гомологичных тионинов (нигеллотионинов) и для пяти из них установлены полные аминокислотные последовательности и проведён филогенетический анализ.

Впервые детально охарактеризована антифунгальная активность выделенных пептидов в отношении широкого спектра микроскопических грибов и дрожжей, включая азол-резистентные клинические изоляты. Показано, что нигеллотионин NsW2 разрушает конидии гриба *Aspergillus niger* в момент их прорастания. С использованием искусственных липидных бислоёв и гигантских однослойных везикул были получены прямые доказательства мембранотропного механизма его действия: NsW2 образует поры в мембранах, имитирующих состав бактериальных и грибных клеток, и индуцирует образование упорядоченных липидных доменов.

Для осуществления дальнейших исследований функциональной активности нигеллотионин NsW2 был получен путём гетерологической экспрессии в прокариотической системе (*Escherichia coli*) в составе рекомбинантного гибридного белка с бактериальным

тиоредоксином. Было показано, что гибридный белок нарушает биосинтез меланина в конидиях *A. niger*. Он был предложен в качестве основы прототипа препарата для защиты растений от грибных болезней. В микровегетационных опытах на семенах ячменя данная химерная молекула оказывала позитивное влияние на всхожесть семян при искусственном заражении. Это открывает новое направление для изучения защитных пептидов растений в качестве регуляторов роста и иммунитета.

Оценка содержания диссертационной работы и её завершённости

Диссертационная работа А.С. Барашковой представляет собой целостное, логически выстроенное исследование, посвящённое комплексному анализу защитных пептидов семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.). Структура работы включает разделы Введение, Обзор литературы, Объекты и методы, Результаты, Обсуждение результатов и Выводы, что соответствует стандартам.

Во **Введении** убедительно обоснована актуальность темы, показана роль антимикробных пептидов растений в фундаментальной биоорганической химии и их потенциал для практических применений. Чётко сформулированы цель и пять конкретных задач. Положения, выносимые на защиту, отражают основные этапы работы и новизну полученных результатов.

Глава 1 (Обзор литературы) содержит глубокий анализ современного состояния исследований в области антимикробных пептидов растений. Автор последовательно рассматривает методы выделения, классификацию, структурные особенности и функциональное разнообразие основных восьми семейств защитных пептидов растений. Особое внимание уделено тионинам, дефензинам и неспецифическим липид-переносящим белкам – центральным объектам собственного исследования. Обзор написан критически, что свидетельствует о широкой эрудиции соискателя и умении анализировать большой объём литературных данных.

Глава 2 (Объекты и методы) детально описывает экспериментальные подходы. Важно отметить, что автор использовала современный междисциплинарный арсенал методов: от классической экстракции и многостадийной хроматографии (аффинная на гепарин-сефарозе, катионообменная на CM-52, обращённо-фазовая ВЭЖХ) до масс-спектрометрии (LC/ESI-MS, MALDI-TOF/TOF), N-концевого секвенирования по Эдману, электрофизиологических измерений на искусственных мембранах, конфокальной и флуоресцентной микроскопии, микробиологических методов, а также гетерологической экспрессии.

В **Главе 3 (Результаты)** представлен основной массив экспериментальных данных. Автором оптимизирована схема выделения защитных пептидов из семян нигеллы (исключение стадии эксклюзионной хроматографии), что позволило повысить эффективность и сократить потери материала. В общей сложности выделено 15 индивидуальных пептидов, из которых 10 являются новыми. Впервые из семян одного растения выделены 9 тионинов (нигеллотioniнов) с высоким сходством первичной структуры, характеризующихся 8-цистеиновым мотивом. Кроме того, охарактеризованы новый дефензин NsD4 и два новых неспецифических липид-переносящих белка NsLTP2 и NsLTP3.

Изучение биологической активности показало, что нигеллотioniны обладают выраженной антифунгальной активностью в отношении как природных, так и клинических изолятов грибов рода *Aspergillus*. Для пептида NsW2 детально исследован механизм действия: он образует поры в искусственных липидных бислоях, содержащих анионные фосфолипиды и эргостерол, и разрушает конидии *A. niger*. Выявлена цитотоксическая активность NsW2 в отношении клеток опухолевых линий. Отдельный блок посвящён получению рекомбинантного гибридного белка Tгх-NsW2; показано, что он, не обладая прямым антифунгальным действием, вызывает депигментацию конидий. Также, он увеличивал выживаемость семян ячменя в условиях искусственного заражения фитопатогенным грибом.

Глава 4 (Обсуждение результатов) содержит обобщение и интерпретацию полученных данных. Автор логично связывает структурные особенности выделенных пептидов (консервативные аминокислотные замены, фосфолипид-связывающий сайт) с их биологической активностью. Особого внимания заслуживает прикладной потенциал работы. Показано, что нативный нигеллотионин NsW2 может рассматриваться как прототип антифунгального и противоопухолевого агента для медицинских целей. В то же время рекомбинантный гибридный белок Trx-NsW2, обладает потенциалом в качестве пестицида нового поколения.

Выводы, представленные в конце работы, полностью соответствуют поставленным задачам и подкреплены экспериментальными данными.

Завершённость работы. Все пять задач, сформулированных во введении, решены в полном объёме: (1) оптимизирована схема выделения пептидов; (2) проведена оценка структурного разнообразия АМП (15 пептидов, 10 новых); (3) изучена биологическая активность АМП; (4) исследовано действие NsW2 на клеточном и молекулярном уровне; (5) оценена эффективность гибридного белка Trx-NsW2 в лабораторных и микровегетационных экспериментах. Цель работы – выделение, оценка структурного разнообразия и исследование спектра биологической активности защитных пептидов семян *N. sativa* – достигнута.

Результаты диссертации опубликованы в 7 статьях в журналах, индексируемых в базах Scopus, Web of Science и RSCI (ядро РИНЦ), и представлены на 8 международных и всероссийских конференциях.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации составлен в соответствии с общепринятой структурой и соответствует установленным нормам. В нём точно и достоверно представлены результаты исследования, а также отражено содержание диссертации и вклад автора в представленные исследования. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Все выводы диссертации базируются на воспроизводимых экспериментальных данных, полученных с использованием современного аналитического оборудования и статистической обработки результатов. Комбинация методов хроматографии (среднего и высокого давления) позволила получить исследуемые пептиды в индивидуальном виде, а применение масс-спектрометрии и автоматического секвенирования по Эдману позволила определить первичные структуры выделенных пептидов (полные или N-концевые). Антимикробные тесты проведены в соответствии с международными стандартами (EUCAST) на референтных штаммах микроорганизмов. Результаты работы неоднократно представлены на всероссийских и международных научных конференциях, опубликованы в рецензируемых журналах (7 статей в изданиях, индексируемых в базах Scopus, Web of Science и RSCI (ядро РИНЦ)). Автореферат полностью отражает содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту.

Замечания к диссертационной работе

При общей высокой оценке работы следует отметить ряд недостатков:

1. В разделе «Объекты и методы» недостаточно полно описаны биоинформатические методы, использованные автором.
2. В главе «Результаты и обсуждение» для некоторых пептидов приведены данные только о минимальной ингибирующей концентрации (МИК), но не исследована их цитотоксичность на эукариотических клетках, что важно для оценки селективности действия.
3. К техническим замечаниям относятся разнообразие в способах цитирования литературы в тексте, недостаток необходимой методической информации в подписях к рисункам, неудачные стилистические обороты и опечатки.

Однако отмеченные недостатки не носят принципиального характера и не ставят под сомнение основные результаты и выводы диссертации.

Заключение

Диссертационная работа **Барашковой Анны Сергеевны** «Изучение структурного разнообразия и биологической активности защитных пептидов из семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.)» является завершённым научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. По актуальности, научной новизне, объёму экспериментального материала и практической значимости она полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

старший научный сотрудник отдела белков растений

Научно-исследовательского института

физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского

Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Элпидина Елена Николаевна

Подпись Элпидина 08.06.2026

Подпись к.б.н. Элпидиной Е.Н. удостоверяю

Учёный секретарь НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

Севостьянова И.А.

М.П.

Контактные данные:

тел.: 7(926)386-32-04 e-mail: elp@belozersky.msu.ru

Адрес места работы:

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

