

Федеральное государственное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы  
биотехнологии»  
Российской академии наук»  
119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр. 2  
Тел. 954-52-83, факс: 954-27-32  
11.02.2016 № 12307-177-120  
на № 201-657.4-135 от 10.02.16

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор  
Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской  
академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН),  
член-корреспондент РАН



В.О. Попов

«11» февраля 2016 г.

#### ОТЗЫВ

ведущей организации, Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН),  
на диссертационную работу Пантелеева Павла Валерьевича  
«Структурно-функциональное исследование антимикробных пептидов  
животного происхождения»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Диссертационная работа П.В. Пантелеева посвящена сравнительному изучению биологического действия антимикробных пептидов животного происхождения, модуляции их антибактериальной активности и цитотоксичности с помощью сайт-направленного мутагенеза.

#### *Актуальность темы исследования.*

Медицина последних десятилетий столкнулась с крайне серьезной проблемой, угрожающей свести на нет достигнутые успехи в терапии инфекционных заболеваний. Эта проблема – массовое распространение антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов. Надежды на расширение пула используемых антибиотиков за счет более широкого скрининга продуцентов традиционных антибиотиков не оправдываются. Антибиотики с принципиально новыми механизмами действия при таких скринингах выявляются крайне редко, а интервал времени, необходимый для появления штаммов бактерий, устойчивых к новому патогену, сокращается и сейчас, как правило, составляет несколько лет.

В этой ситуации оправданным представляется переход к поиску и внедрению в практику антибиотических препаратов из других источников и с другими механизмами действия на бактериальную клетку, ограничивающими возможность селекции устойчивых мутантных форм. Одной из таких перспективных групп соединений являются защитные антимикробные пептиды многоклеточных животных. На сегодняшний день описано большое число таких пептидов, обнаруженных у животных разных систематических групп – членистоногих, хордовых, иглокожих и др. Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) рассматриваются как эволюционно древние универсальные элементы системы врожденного иммунитета животных. Для большинства АМП мишенью являются мембраны клеток патогенных микроорганизмов. В отличие от связывания с конкретными молекулярными рецепторами, защита от которого обеспечивается локальными мутациями, перестройка наружной мембраны бактерии требует одновременного изменения многих процессов, обеспечивающих ее формирование, и поэтому в эволюционном плане куда менее вероятна. Таким образом, риск появления резистентных штаммов при применении АМП значительно ниже по сравнению с традиционными антибиотиками предыдущих поколений.

Из различных видов АМП особый интерес представляют бета-спилечные пептидные структуры, стабилизированные дисульфидными связями. Это семейство весьма разнообразно как в структурном отношении, так и по вариантам, обнаруженным у разных организмов. Имеется большое количество публикаций, посвященных оценке антибактериальных свойств таких соединений. Однако эти исследования разрознены, реализуются на основании разных методических подходов и не обеспечивают возможности корректно сравнивать разные АМП, доказательно рекомендовать их структурные модификации, оправданные для повышения антибактериального действия и снижения цитотоксичности для клеток человека (и сельскохозяйственных животных).

В этой связи крайне востребованной представляется разработка научно-методического инструментария, позволяющего анализировать структурно-функциональные взаимосвязи в молекулах АМП, выделять ключевые элементы в составе АМП, обеспечивающие проявление ими биологической активности. Именно эта проблема рассматривается в диссертационной работе П.В. Пантелеева.

Приведенная выше краткая характеристика современного уровня разработок по тематике диссертации однозначно свидетельствует об актуальности и практической востребованности исследования, проведенного П.В. Пантелеевым.

#### *Структура и содержание диссертации.*

Работа изложена на 130 страницах и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Библиографический список» (462 ссылки). Работа содержит 37 рисунков и 8 таблиц.

Вводная часть (3 страницы) дает краткую характеристику изучаемой в диссертационной работе проблемы, ее места в контексте современных исследований. Исходя из анализа функций АМП, их представленности в живой природе и потенциала практического применения аргументированно ставятся задачи исследования.

Обзор литературы (глава 2 диссертации) направлен на характеристику структурного разнообразия АМП. Обсуждаются существующие подходы к классификации АМП, число которых в настоящее время достигло четырех тысяч. С учетом задач, решаемых в диссертационной работе, рассматриваются основные АМП, описываемые в соответствии с количеством дисульфидных связей (от одной до четырех), стабилизирующих их бета-спилечную структуру. Наиболее детально рассмотрены такие практически востребованные группы АМП, как бактенецины, лактоферрицины, ареницины, протегрины, дефенсины, гепцидины. Охарактеризованы их структурные особенности, представленность в живой природе, отличия у разных групп организмов,

существующие представления о структурных элементах и отдельных аминокислотах, обеспечивающих их биологическое действие. Специальное внимание уделяется АМП, выделенным из обособленных, эволюционно древних систематических групп – мечехвосты, скорпионы. В рамках обсуждения свойств различных АМП рассматриваются инструментарий, используемый для характеристики их антибактериальной активности, продвижение работ, направленных на практическое применение фармпрепаратов на основе АМП.

Проведенный детальный анализ позволил диссертанту систематизировать наиболее значимые структурно-функциональные особенности бета-шпилечных АМП, обосновать выбор объектов исследования, показать целесообразность генно-инженерной модификации для получения более эффективных препаратов.

Представленный в диссертации анализ литературы дает адекватное представление о современном состоянии исследований по проблематике работы. Материал хорошо структурирован и четко изложен; рассмотрен весь ряд вопросов, значимых для постановки задач исследования и содержательной интерпретации получаемых результатов. Рассмотрено значительное число публикаций (389, а включая библиографию введения – 400), в том числе работы последних лет. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации автора, хорошем знакомстве с современным уровнем исследований по тематике выполненной работы.

Глава 3 диссертации («Материалы и методы») содержит описание оборудования, реактивов, программного обеспечения и методик, использованных в ходе исследований. Рассмотрены все стадии работ по созданию генно-инженерных конструкций, проведение сайт-направленного мутагенеза, культивирование штаммов-продуцентов, выделение и очистка рекомбинантных АМП, тестирование их антимицробной, гемолитической и ДНК-связывающей активности, цитотоксичности, регистрация проницаемости клеточных мембран бактериальных клеток, тестирование стабильности АМП в сыворотке крови. Данный комплекс методов и подходов отражает современный методический уровень исследований в области биоорганической химии, создает основу для эффективного решения поставленных задач, получения наиболее информативных результатов. Детальное изложение всех этапов проведения экспериментов обеспечивает однозначность интерпретации результатов исследования, описанных в последующих разделах диссертационной работы. Не вызывает сомнения приобретение П.В. Пантелеевым при выполнении диссертационной работы хорошей квалификации в области биоорганической химии.

Глава 4 («Результаты и обсуждение») посвящена изложению экспериментов, проведенных диссертантом с использованием выбранных им представителей семейства АМП и направленных на изучение взаимосвязей между их структурными особенностями и биологическим действием. Данные работы включали структурно-функциональную характеристику ареницина-1, а также его полноразмерных и укороченных аналогов, структурно-функциональную характеристику тахиплезина-1, получение рекомбинантных аналогов АМП посредством введения в их структуру единичных аминокислотных замен, тестирование их индивидуального и совместного действия на бактерии. Данный ряд экспериментов четко направлен на решение задач, поставленных в диссертационной работе. Полученные результаты и их интерпретация изложены корректно. Эксперименты четко взаимосвязаны друг с другом и позволяют убедительно сформулировать итоговые выводы по результатам проведенного исследования.

В заключительных главах диссертации дается обобщение полученных результатов и формулируются выводы, отражающие достижение диссертантом поставленной цели исследования. Рассмотрение всех этих вопросов проведено корректно, четко связано с ранее представленными экспериментальными данными. Выводы и рекомендации на основании полученных результатов вполне обоснованы.

Содержание диссертационной работы П.В. Пантелеева соответствует специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

*Новизна исследования и полученных результатов.*

Диссертантом проведено комплексное структурно-функциональное исследование рекомбинантных препаратов АМП, в том числе вариантов природных соединений, полученных с использованием сайт-направленного мутагенеза. Выявлены основные структурные элементы АМП, ответственные за биологическое действие пептидов, показана возможность улучшения их терапевтических возможностей (усиления антибактериального действия и снижения цитотоксичности) посредством единичных аминокислотных замен.

Следующие результаты исследования, проведенного П.В. Пантелеевым, представляются наиболее значимыми:

- Получено 9 рекомбинантных антимикробных пептидных препаратов, 45 мутантных аналогов пептидов АМП ареницина-1 из морского червя *Arenicola marina* и тахиплезина-1 из мечехвоста *Tachypleus tridentatus*.
- Разработаны методические решения по гетерологической экспрессии в бактериальной системе и последующей очистке аналогов бета-спилечных АМП.
- Сопоставлено влияние аминокислотных замен разных участков молекул АМП на их биологическое действие.
- Показана взаимосвязь между переходом ареницина-1 в димерную форму и проявлением высокой гемолитической активности пептида.
- На примере тахиплезина-1 показано, что точечные замены гидрофобных аминокислотных остатков эффективно обеспечивают снижение цитотоксичности АМП.
- Установлены эффекты кооперативности при совместном применении нескольких АМП.

*Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.*

Диссертационная работа П.В. Пантелеева представляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком научном и экспериментальном уровне. Используемый при обработке экспериментальных данных математический аппарат обеспечивает достоверность и высокую точность получаемых количественных характеристик. Достоверность результатов исследования не вызывает сомнений. Описываемые эффекты и закономерности подтверждены корректно планируемыми контрольными экспериментами. Для оценки биологического действия тестируемых препаратов использованы методические подходы, эффективность которых подтверждена в ряде предшествующих исследований. Обсуждаемые в работе результаты по повышению антибактериального действия и снижению цитотоксичности статистически достоверны.

Выводы и рекомендации, сформулированные на основании полученных результатов, обоснованы, полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Результаты работы представлены научному сообществу в форме двенадцати докладов на российских и международных научных конференциях (с публикацией тезисов); основные положения и выводы диссертации рассмотрены в шести статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ (2 статьи – в отечественных и 4 – в зарубежных журналах). В публикациях П.В. Пантелеева представлены все основные результаты диссертационной работы.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Описываемые в разделе «Результаты и обсуждение» исследования были начаты со скринингового сопоставления девяти видов АМП, на основании которого в качестве приоритетных объектов для дальнейших экспериментов были выбраны ареницин-1 и тахиплезин-1. Однако таблица в разделе 6 в разделе 4.3, к которой адресуется диссертант, содержит сведения только об антибактериальной активности (величине МИК) сопоставляемых препаратов. В рамках дальнейших работ одной из важных задач было повышение терапевтического индекса АМП посредством конструирования мутантных форм, но в рамках диссертации не комментируется, какие величины терапевтических индексов характерны для вариантов АМП, отбракованных на стадии первичного скрининга.
2. При обсуждении экспериментальных данных о свойствах мутантных форм ареницина-1 диссертант в ряде случаев сравнивает их с природным ареницином-1 (стр. 76, 78, 80, 82, 85, 87). Однако текст диссертации не содержит информации о предоставленном препарате или самостоятельном выделении ареницина-1 из *Arenicola marina*. В связи с этим необходимо уточнить, с какими именно препаратами (или источниками информации) проводились соответствующие сравнения.

Данные соображения не снижают общую положительную оценку работы.

*Значимость полученных результатов для науки и производства.*

Диссертантом показаны возможности эффективной модуляции биологической активности антимикробных пептидов посредством единичных аминокислотных замен. С использованием широких панелей мутантных форм АМП проведено сравнительное изучение их действия на бактериальные и животные клетки, разработаны подходы к доказательному анализу наблюдаемых структурно-функциональных взаимосвязей. Выявлены структурные элементы изученных животных АМП, играющие ключевую роль в обеспечении антибактериальной активности и выраженности цитотоксичности.

Практическая значимость работы П.В. Пантелеева заключается в создании ряда менее токсичных (*in vitro* и *in vivo*) аналогов природных бета-шпилечных АМП, которые характеризуются высокой антибактериальной активностью. Это исследование может быть основой для разработки технологии и внедрения в практику антибиотических препаратов нового поколения, с низкой вероятностью появления резистентных к ним штаммов патогенов.

*Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.*

Результаты и выводы диссертации представляют значительный интерес как для развития исследований по характеристике животных АМП и их использованию в медицине в качестве новых антибактериальных препаратов, так и для расширения общетеоретических представлений о вкладе отдельных структурных компонентов пептидов в проявления их биологической активности.

С полученными в диссертационной работе результатами целесообразно ознакомить следующие организации: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Химический и Биологический факультеты), Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Институт физиологически активных веществ РАН (г. Черноголовка), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Пущино), Государственный научно-

исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России (г. Санкт-Петербург), Институт экспериментальной медицины РАН (г. Санкт-Петербург), Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН (г. Владивосток), Дальневосточный федеральный университет (г. Владивосток), Институт биоорганической химии НАН Беларуси (г. Минск).

*Заключение.*

По актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Пантелеева Павла Валерьевича является законченным исследованием высокого теоретического и экспериментального уровня и соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и утвержден в ФИЦ Биотехнологии РАН на межлабораторном семинаре с участием отдела медицинской микробиологии, лабораторий биомедицинских исследований и иммунобиохимии (протокол № 1 от 28 января 2016 г.).

Заведующий лабораторией биомедицинских исследований  
Федерального государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»  
д.б.н., профессор Шишкин Сергей Сергеевич

Адрес: Ленинский проспект, 33, стр. 2, ФИЦ Биотехнологии РАН  
Телефон: 7 495 952-58-86  
E-mail: shishkin@inbi.ras.ru

*Подпись Шишкина С.С. заверяю*

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,  
к.б.н. Орловский А.Ф.

