

Отзыв официального оппонента

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 – биорганическая химия

В последние десятилетия проблема устойчивости микроорганизмов к используемым в медицине антибиотическим препаратам решалась в основном путем химической модификации структуры уже известных молекул. Однако при этом достигается лишь временный эффект. Очевидно, что выход из сложившейся ситуации может быть связан с введением в клиническую практику принципиально новых классов антимикробных соединений. Одной из наиболее интенсивно изучаемых в последнее время областей биологической науки являются исследования факторов врожденного иммунитета, обеспечивающих быструю защиту организма-хозяина от инфицирования патогенными микроорганизмами. Одними из ключевых эффекторных молекул системы врожденного иммунитета являются защитные пептиды, которые были открыты благодаря их выраженной антимикробной активности и вследствие этого названные антимикробными. Фундаментальные исследования молекулярных механизмов действия антимикробных пептидов (АМП) тесно связаны с прикладными разработками, поскольку они могут стать прототипами лекарственных средств, в частности, антибиотиков широкого спектра действия. Мембранотропный механизм действия и способность достаточно быстро уничтожать бактерии препятствуют формированию резистентности к АМП. Тем не менее, сравнительно высокая цитотоксичность ряда природных пептидов ограничивает их дальнейшее применение. Все вышесказанное определяет необходимость структурно-функциональных исследований АМП и поиска закономерностей, позволяющих предсказывать биологические свойства и активность этих молекул, что свидетельствует в пользу актуальности данной работы.

В диссертационной работе Пантелеева П.В. было проведено структурно-функциональное исследование ряда АМП животного происхождения с целью поиска подходов, позволяющих снизить цитотоксические эффекты при использовании этих соединений. В качестве матриц для создания менее токсичных соединений среди полученных автором рекомбинантных АМП были отобраны β -шпилечные АМП ареницин-1 пескожила *Arenicola marina* и тахиплезин-1 мечехвоста *Tachypleus tridentatus*, обладающие целым рядом привлекательных свойств. В задачи автора входило изучение взаимосвязи структуры и биологических свойств этих пептидов с помощью направленного мутагенеза,

создание терапевтически ценных мутантных производных, а также изучение эффектов совместного действия различных защитных пептидов.

Диссертационная работа написана по традиционной форме, представлена на 130 страницах, иллюстрирована 37 рисунками и 8 таблицами. В библиографическом списке представлено 462 источника, что, с одной стороны, несколько превышает разумные пределы, с другой – дает исчерпывающее представление о структурно-функциональных особенностях известных к настоящему моменту β -спилечных АМП, которым и была посвящена основная часть литературного обзора диссертации.

В разделе «Материалы и методы» весьма тщательно описаны использованные в работе подходы и методики. При выполнении работы диссертантом использован широкий спектр физико-химических методов (хроматография, электрофорез, диализ, спектроскопические и флуориметрические методы), методов молекулярной биологии и генной инженерии, а также методов, используемых в микробиологии и биотехнологии. Все это свидетельствует о высоком методическом уровне представленной работы.

Основные результаты диссертационной работы приведены в соответствующем разделе. Сразу стоит отметить, что результатами данной работы следует считать не только разработку терапевтически ценных аналогов антимикробных пептидов, но и создание подходов, которые автор успешно для этого применил. На первом этапе была получена широкая панель рекомбинантных аналогов природных АМП, каждый из которых был синтезирован в составе гибридного белка, нейтрализующего биологическую активность пептидов. Удачный выбор схемы биотехнологического получения позволил достигнуть высоких выходов целевого продукта, а её дальнейшая оптимизация привела к созданию технологий, значительно упрощающих синтез и скрининг новых производных. Далее с использованием методов направленного мутагенеза было проведено подробное структурно-функциональное исследование ареницина-1 и тахиплезина-1 как наиболее активных АМП из пула проанализированных рекомбинантных пептидов. В результате, были получены 45 мутантных аналогов и выявлены ключевые аминокислотные остатки, обуславливающие как антимикробные, так и цитотоксические свойства исследуемых соединений. В частности, было установлено, что введение остатка серина или аргинина в гидрофобную область структуры пептидов приводит не только к снижению цитотоксических свойств, но и, в отдельных случаях, к повышению антимикробной активности. С использованием спектрометрических методов анализа автором было продемонстрировано, что потеря способности ареницина к димеризации является основной причиной снижения гемолитических свойств у наименее токсичных аналогов. Стоит отметить, что для успешного осуществления данного этапа эксперимента была разработана технология получения рекомбинантного аналога V8R, тотально меченного стабильным изотопом ^{15}N . Основываясь на гомологии первичной структуры у отдельных представителей семейства β -спилечных АМП,

автор осуществил дизайн укороченных производных ареницина-1, обладающих высоким терапевтическим индексом. Дальнейшие исследования были нацелены на исследование механизма действия и подробное изучение биологических свойств полученных в работе АМП: активности в отношении мультирезистентных клинических изолятов бактерий, цитотоксичности в отношении культур эукариотических клеток, острой токсичности в отношении мышей, стабильности в сыворотке крови. Полученные диссертантом данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале β -шпилечных защитных пептидов, а синтезированные аналоги сами по себе являются перспективными кандидатами для дальнейших биологических испытаний с целью разработки новых лекарственных средств. Практический и теоретический интерес представляют результаты тестирования антимикробной активности защитных пептидов, действующих в синергизме друг с другом. Было показано, что активность АМП, имеющих внутриклеточные мишени, может быть в значительной степени повышена в присутствии субингибирующих концентраций тахиплезина-1, при которых не проявляются негативные эффекты в отношении нормальных клеток млекопитающих.

У меня нет принципиальных замечаний по научному содержанию работы. Однако стоит отметить ряд небольших замечаний и пожеланий:

1. Для того, чтобы с уверенностью говорить об отсутствии кросс-устойчивости к АМП у мультирезистентных клинических изолятов, было бы желательно провести аналогичные испытания в отношении полимиксин-резистентных изолятов, поскольку данная группа липопептидных антибиотиков близка по своему механизму действия к мембранотропным АМП.

2. Снижение цитотоксических эффектов для исследуемых аналогов V8R и ALP1, показанных в экспериментах *in vitro*, сохраняется и при тестировании острой токсичности в отношении мышей. На мой взгляд, было бы интересно провести испытания *in vivo* антимикробной активности пептидов, чтобы подтвердить сохранение высокой антибактериальной активности аналогов, продемонстрированное в условиях *in vitro*.

3. В диссертации и автореферате присутствует ряд опечаток. Например, в подписях к рис. 9Б автореферата и рис. 36 диссертации.


Высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общего положительного впечатления от работы Пантелеева П.В., которая в полной мере отвечает требованиям, предъявляемым к диссертационным работам.

В целом работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, обладает теоретической и практической значимостью, расширяет представления о взаимосвязи структуры и биологических свойств антимикробных пептидов. Полученные результаты являются убедительными, а сделанные автором выводы не вызывают сомнений. Содержание автореферата отражает основные результаты и выводы диссертации. Результаты диссертации были опубликованы в 6 статьях в солидных рецензируемых журналах. Апробация работы была проведена на 12

отечественных и международных конференциях. Диссертационная работа Пантелеева Павла Валерьевича 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.

Заведующий отделом нанобиотехнологии
Всероссийского научного центра
молекулярной диагностики и лечения

член-корреспондент РАН, д.х.н.,
профессор
(«химия природных и физиологически
активных веществ» - 02.079)

 Северин Е.С.

Адрес: 117638, Москва, Симферопольский бульвар, 8
Телефон: 8-985-776-31-17 E-mail: e.severin@mail.ru

09.02.2016

Подпись д.х.н. Северина Е.С.

«Удостоверяю»:

Учёный секретарь ОАО ВНИЦМДЛ
к.т.н. Е.Е. Зотова

