



**МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
( МГУ )**

Ленинские горы, Москва,  
ГСП-1, 119991  
Телефон: 939-10-00  
Факс: 939-01-26

10.02.2016 № 17-16/203-03  
На № \_\_\_\_\_

**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 – «биоорганическая химия»**

В процессе исследований молекулярных факторов и механизмов, лежащих в основе защитных реакций живого организма, был открыт целый ряд природных молекул, продуцируемых позвоночными и беспозвоночными животными, растениями, грибами и бактериями. Среди факторов белково-пептидной природы особую роль в системе врожденного иммунитета многоклеточных организмов играют так называемые антимикробные пептиды (АМП). Для большинства АМП мишенью действия являются мембраны клеток патогенных организмов, а механизм действия связан с нарушением нормальной проницаемости их мембран. Несмотря на наличие ряда преимуществ АМП перед традиционными антибиотиками, наиболее весомым из которых является сравнительно невысокая вероятность развития устойчивости со стороны бактерий, данные пептиды не лишены и ряда существенных недостатков. В частности, многие высокоактивные АМП животного происхождения проявляют токсичность в отношении нормальных клеток млекопитающих, что является препятствием для их применения в качестве лекарственных средств.

Диссертационная работа Пантелеева П.В. посвящена проведению структурно-функционального исследования антимикробных пептидов животного происхождения, в частности небольших и высокоактивных  $\beta$ -спилечных АМП ареницина-1 и тахиплезина-1 с целью поиска подходов, позволяющих снизить цитотоксические эффекты при использовании этих соединений. На фоне снижения эффективности традиционной антибиотикотерапии, которое связано, в первую очередь, со стремительным ростом числа резистентных возбудителей инфекционных заболеваний, АМП в последние годы привлекают всё больше внимания в качестве возможных прототипов

антимикробных препаратов, а также иммуномодуляторов нового поколения. Таким образом, цели и задачи, поставленные автором данного исследования, несомненно, являются актуальными.

Диссертационная работа построена по классической схеме и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы (462 наименований). Работа изложена на 130 страницах текста, содержит 37 рисунков и

8 таблиц. Литературный обзор по большей части сфокусирован на особенностях биосинтеза, структуры и биологических свойств всех известных на данный момент представителей семейства  $\beta$ -спилечных АМП животного происхождения. Литературные данные хорошо обобщены и сведены в таблицы, что в значительной мере повышает эффективность восприятия материала. Кроме того сравнительный анализ структуры и функций  $\beta$ -спилечных АМП позволил автору грамотно сформулировать задачи и достичь поставленной цели. Стоит также отметить, что на основе представленного автором материала была опубликована обзорная статья в рецензируемом научном журнале «Acta Naturae».

В главе «Материалы и методы» описаны основные методические приемы, использованные автором в ходе выполнения работы. Глава написана достаточно подробно и не вызывает возражений. Результаты исследования суммированы в соответствующей главе, которая разбита на три основных подглавы. На начальном этапе автором был проведен сравнительный анализ биологической активности целого ряда рекомбинантных антимикробных пептидов животных, некоторые из которых были ранее открыты и охарактеризованы сотрудниками Учебно-научного центра ИБХ. Разработанная автором схема сайт-направленного мутагенеза в сочетании с гетерологической экспрессией в бактериальной системе была использована для получения широкого спектра аналогов антимикробных пептидов ареницина-1 из целоцитов морского кольчатого червя *Arenicolamarina* тахиплезина-1 из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus*. В ходе сопоставления биологической активности и физико-химических свойств полноразмерных аналогов ареницина-1, исследованных методами ОФ-ВЭЖХ и КД-спектроскопии, было высказано предположение, что наибольшее влияние на гемолитическую активность пептида оказывает процесс димеризации. Прямая связь этих явлений была успешно подтверждена путем исследования пространственной структуры аналога V8R, тотально меченного стабильным изотопом  $^{15}\text{N}$ , в мембранно-имитирующей среде. Далее был проведен дизайн и биосинтез укороченных аналогов ареницина-1. Основным результатом данного этапа работы стало создание селективных аналогов V8Rи ALP1, терапевтический индекс которых по сравнению с природной молекулой возрос в 50 и 34 раза, соответственно. Сохранение полученными аналогами механизма действия природного пептида было подтверждено как фотометрическими и флуориметрическими методами, так и тестированием ДНК-связывающей активности. Полученные соединения продемонстрировали высокую эффективность в отношении устойчивых к традиционным антибиотикам штаммов бактерий. В ходе исследования цитотоксичности в отношении нормальных клеток млекопитающих, а также острой токсичности для мышей автором была подтверждена повышенная безопасность разработанных аналогов. Схожим образом были

получены и отобраны более селективные аналоги АМП тахиплезина-1. Отдельного внимания заслуживает создание упрощенной и более эффективной схемы биотехнологического получения тахиплезина-1 и его производных. Показанная в работе сравнительно высокая устойчивость  $\beta$ -спилечных АМП к протеолитической деградации в сыворотке крови человека позволяет рассматривать возможность системного применения данных пептидов. На заключительном этапе работы в ходе изучения совместного действия АМП была показана способность тахиплезина-1 при действии в субингибирующих концентрациях восстанавливать антибактериальную активность защитных пептидов животных в присутствии хлорида натрия в физиологической концентрации.

#### Замечания по диссертации

1. Приведенные в диссертации результаты свидетельствуют об эффективности используемых схем биосинтеза и очистки антимикробных пептидов. При этом автором не обсуждается вопрос масштабирования этих схем для получения перспективных аналогов в препаративных количествах с целью проведения расширенных биологических испытаний.
2. В ходе исследования синергических антибактериальных эффектов автор использует различные пары антимикробных пептидов, моделируя тем самым взаимодействие защитных молекул в природе. На мой взгляд, с целью практического применения также было бы желательно протестировать пары «антимикробный пептид – конвенциональный антибиотик», причем использовать в первую очередь гидрофобные антибиотики, доставка которых к внутриклеточным мишеням в клетку затруднена.
3. В работе корректность замыкания дисульфидных связей в пептидах была доказана путем гидролиза трипсином, с последующим разделением на ОФ-ВЭЖХ и анализом фракций с помощью масс-спектрометрии. Не было бы лишним включить данные результатов этого эксперимента в материалы диссертации.

Стоит отметить, что все приведенные выше замечания не снижают ценности данной диссертационной работы.

Подводя итог всему сказанному ранее, можно заключить, что диссертантом проделана большая по объему экспериментов работа и получен ряд важных в теоретическом и практическом плане результатов. Автором было высказано предположение и далее экспериментально доказано, что природные  $\beta$ -спилечные АМП могут быть использованы в качестве матрицы для создания менее токсичных аналогов, сохраняющих высокую антибактериальную активность и мембранолитический механизм действия. Разработаны подходы для биоинженерии менее токсичных аналогов  $\beta$ -спилечных АМП. В частности, на примере ареницина-1 и тахиплезина-1 была показана возможность подавления побочной цитотоксичности  $\beta$ -спилечных пептидов путем нарушения процесса димеризации молекул, а также направленного изменения длины  $\beta$ -спилки и амфифильности структуры. Проведенное исследование показывает высокий терапевтический

потенциал  $\beta$ -спилечных АМП как основы для создания нового класса антибиотиков. Достижением диссертанта также является разработка и оптимизация методов гетерологической экспрессии и очистки целого ряда антимикробных пептидов. Несомненно, практическая значимость данной работы заключается в создании ряда менее токсичных аналогов природных  $\beta$ -спилечных АМП, сохраняющих высокую антибактериальную активность и являющихся потенциальными кандидатами для предклинических испытаний в качестве антибиотиков широкого спектра действия. Диссертационная работа выполнена на высоком современном экспериментальном уровне с применением широкого арсенала методов молекулярной биологии, микробиологии, гетерологической экспрессии и химии белка, а также ряда физических методов. Данная работа представляет интерес как для дальнейших фундаментальных, так и прикладных исследований. Достоверность и новизна полученных результатов не вызывает сомнений, а сформулированные выводы непосредственно вытекают из результатов работы и абсолютно логичны. Содержание автореферата отражает основные результаты и выводы диссертации. Результаты диссертации были опубликованы в 6 статьях в международных рецензируемых журналах и были представлены на российских и международных конференциях. Диссертационная работа Пантелеева Павла Валерьевича является цельным законченным исследованием и соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 –биоорганическая химия.

Заведующий отделом хроматографического анализа

НИИФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

имени М.В. Ломоносова

доктор химических наук (02.00.10), профессор

Баратова Л.А.



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

Телефон: (495)939-54-08; E-mail: baratova@belozersky.msu.ru

«Удостоверяю»

Директор НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

академик



Скулачев В.П.