

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Барашковой Анны Сергеевны
«Изучение структурного разнообразия и биологической активности защитных пептидов
из семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.)»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертационная работа Барашковой А.С. посвящена актуальной задаче современной биоорганической химии – комплексному исследованию защитных пептидов растений, обладающих антимикробной и цитотоксической активностью. Семена нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.) являются ценным источником биологически активных соединений, однако их пептидный состав оставался изученным фрагментарно. Систематическое выделение, структурная характеристика с использованием современных физико-химических методов и оценка биологической активности представляют несомненный интерес для фундаментальной науки и открывают перспективы для создания новых антимикробных и противоопухолевых препаратов, а также средств защиты растений.

На основании автореферата можно заключить, что соискателем выполнен значительный по объёму и методическому уровню комплекс экспериментальных исследований. Разработана оптимизированная схема выделения защитных пептидов, включающая уксуснокислую экстракцию, аффинную хроматографию и высокоэффективную жидкостную хроматографию, что позволило существенно упростить процедуру фракционирования по сравнению с ранее известными протоколами и обеспечить высокую воспроизводимость результатов. В ходе работы идентифицировано 15 индивидуальных пептидов, из которых 10 описаны впервые. Автор показал, что семена нигеллы содержат представителей трёх структурных семейств защитных пептидов – дефензинов, неспецифических липид-переносящих белков и тионинов, причём для тионинов впервые экспериментально подтверждён биосинтез нескольких изоформ в одном растении.

Особого внимания заслуживает методический уровень работы в части структурной характеристики пептидов. Автором корректно применён комплекс современных аналитических подходов: MALDI-TOF масс-спектрометрия, автоматическое N-концевое секвенирование по Эдману, а также биоинформатический анализ (BLASTp, филогенетическое построение). Использование MALDI-TOF масс-спектрометрии позволило с высокой точностью определить молекулярные массы выделенных пептидов (в диапазоне 5,0–5,3 кДа для тионинов, 5,7 кДа для дефензинов и 9,4 кДа для нсЛПБ) и подтвердить их индивидуальность. Детальное секвенирование N-концевых участков в сочетании с масс-спектрометрией дало возможность надёжно отнести пептиды к соответствующим семействам и установить степень гомологии с известными защитными пептидами других растений. Так, для одного из дефензинов показана высокая идентичность дефензином редиса, а для нигеллотионинов построено филогенетическое древо, демонстрирующее их обособленное положение среди тионинов других ботанических семейств. Важно, что автор не ограничился идентификацией основных компонентов, но также охарактеризовал минорные изоформы (NsW5–NsW9), что свидетельствует о тщательности и полноте проведённого скрининга. Такой подход позволяет оценить структурное разнообразие пептидного пула семян нигеллы на качественно новом уровне.

С биологической точки зрения работа также чрезвычайно содержательна. Показано, что выделенные пептиды обладают широким спектром антимикробной активности: нсЛПБ NsLTP3 активен против фитопатогенных бактерий и мицелиальных грибов, а нигеллотионины, особенно NsW2, проявляют выраженную антифунгальную активность и цитотоксичность в отношении опухолевых клеток. Важно отметить, что детальное изучение механизма действия нигеллотионина NsW2 с использованием методов флуоресцентной микроскопии и модельных липидных мембран позволило установить его поробразующий механизм, что подтверждает гипотезу о мембранотропном действии тионина и открывает путь для направленного дизайна их производных.

Автор описывает создание рекомбинантного гибридного белка Trx-NsW2, экспрессированного в *E. coli*, и демонстрирует его фунгистатического, ростостимулирующего и иммуномодулирующую активность на культурные растения в микровеgetационных опытах. Этот результат выводит исследование на прикладной уровень, показывая возможность использования нигеллотионинов в качестве прототипов препаратов для защиты сельскохозяйственных культур, а также подчёркивает биотехнологический потенциал работы.

Автореферат построен по классической схеме, материал изложен последовательно и логично, содержит все необходимые разделы: актуальность, цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, положения, выносимые на защиту, и выводы. Текст хорошо иллюстрирован (15 рисунков, 3 таблицы), что облегчает восприятие экспериментальных данных. Основные результаты опубликованы в 5 статьях в высокорейтинговых рецензируемых журналах (Q1) и апробированы на 8 международных и всероссийских конференциях. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, поскольку они получены с использованием современного сертифицированного оборудования и международных протоколов, а также согласуются с данными независимых методов (хроматография, масс-спектрометрия, секвенирование, биоинформатика).

Принципиальных замечаний к автореферату нет. Методический уровень работы, соответствует самым высоким стандартам биоорганической химии и может служить образцом для подобных исследований.

Заключение:

По актуальности, научной новизне, методическому уровню, объёму и достоверности полученных результатов, а также их теоретической и практической значимости диссертационная работа Барашковой Анны Сергеевны полностью соответствует критериям, установленным п. 9–14 «Положения о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с последующими изменениями), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, а её автор несомненно заслуживает присуждения искомой степени.

Заместитель генерального директора по научной работе,
заведующий лабораторией генной инженерии,
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического
агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России),
доктор биологических наук, доцент
Лазарев Василий Николаевич



Лазарев В.Н.

Адрес: 119435, Россия, Москва, Малая Пироговская, д. 1а
Тел: +7 (499) 245-0471
e-mail: lazarev@rcpcm.org

Подпись Лазарева В.Н. удостоверяю
Учёный секретарь

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России



Кострюкова Е.С.