ОТЗЫВ

официального оппонента

Кострова Сергея Викторовича, доктора химических наук,

профессора, член-корреспондента РАН

на диссертационную работу Сафроновой Виктории Николаевны

«Поиск и характеристика новых BRICHOS-ассоциированных антимикробных пептидов»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия

Актуальность темы исследования

Распространение штаммов бактерий, устойчивых к применяемым антибиотикам, обусловливает необходимость поиска новых антибактериальных соединений. Возможности применения ряда препаратов резерва ограничены их токсичностью, а получение производных на основе известных антибиотиков не всегда позволяет преодолевать устойчивость возбудителей вследствие возможной перекрестной резистентности. Особенно сложной задачей остается разработка средств против грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану в качестве дополнительного барьера, ограничивающего проникновение многих антибиотиков. Природные антимикробные пептиды характеризуются разнообразием структур и механизмов действия, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных молекул для дальнейшего исследования. В качестве источника биологически активных соединений в данном исследовании были выбраны морские полихеты – группа беспозвоночных животных, защита которых от микроорганизмов обеспечивается механизмами врожденного иммунитета, в том числе антимикробными пептидами. Таким образом, актуальность диссертационной работы Сафроновой В.Н. определяется как поиском новых пептидов, перспективных для создания антибактериальных средств, так и расширением представлений о биоразнообразии защитных молекул у полихет.

Общая характеристика, структура и содержание диссертации

Диссертация Сафроновой В.Н. построена по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, разделы «материалы и методы» и «результаты и обсуждение», заключение, выводы и список литературы. Изложение результатов следует основным этапам исследования: от поиска потенциальных защитных пептидов и изучения их свойств

до отбора наиболее перспективных соединений и оценки их эффективности на животных моделях.

В литературном обзоре рассмотрены структурное разнообразие антимикробных пептидов, механизмы их действия и особенности биосинтеза у животных. Автор сопоставляет организацию белков-предшественников защитных пептидов позвоночных и беспозвоночных животных, уделяя особое внимание BRICHOS-содержащим белкам полихет и изученным функциям этого домена у млекопитающих. Представленные данные показывают, что разнообразие BRICHOS-ассоциированных антимикробных пептидов полихет изучено недостаточно, и обосновывают выбранную стратегию их поиска по наличию BRICHOS-домена в белках-предшественниках. В заключительной части обзора обсуждаются перспективы применения антимикробных пептидов, ограничения их дальнейшей разработки и подходов к улучшению их свойств.

В разделе «Материалы и методы» описаны подходы, использованные для поиска, получения и всесторонней характеристики новых антимикробных пептидов. BRICHOS-ассоциированные пептиды выявляли при анализе транскриптомов морских полихет, а отобранные соединения получали в составе рекомбинантных гибридных белков. Для очистки и контроля полученных образцов применяли ВЭЖХ и масс-спектрометрию, вторичную структуру отдельных пептидов оценивали с помощью спектроскопии кругового дихроизма, а порядок замыкания дисульфидных связей исследовали путем анализа фрагментов, образующихся при триптическом гидролизе. Биологические свойства пептидов оценивали по их действию на бактериальные культуры и биопленки, гемолитической и цитотоксической активности, а также стабильности в сыворотке крови. Для изучения механизмов действия использовали тесты на проницаемость и деполяризацию бактериальных мембран, электрохимические измерения на модельных бислойных липидных мембранах и анализ штаммов со сниженной чувствительностью. Взаимодействие пептида Ap9 с комплексом LptD/LptE изучали методом микротермофореза, а изменения структуры пептида в присутствии липополисахарида – с помощью ЯМР-спектроскопии. Совокупность этих методов позволила перейти от первичной оценки характеристики обнаруженных пептидов к углубленному исследованию наиболее перспективных соединений.

Основной экспериментальный материал диссертации показывает, что использование BRICHOS-домена в качестве консервативного фрагмента позволяет обнаруживать пептиды, существенно различающиеся по структуре и антимикробной активности. При этом среди обнаруженных соединений были выявлены перспективные молекулы для дальнейшего изучения. Следует отметить обоснованность перехода от изучения природных соединений

к направленной модификации β-шпилечных пептидов с учетом их активности и селективности, а также последующего выбора целевых соединений для подтверждения их терапевтического потенциала. Для полученного аналога абареницина Ap9 также приведен подробный анализ его действия на бактериальные клетки. Таким образом, выполненная работа представляет собой последовательно выстроенное исследование, в котором результаты каждого этапа служат обоснованием для выбора дальнейших направлений изучения обнаруженных пептидов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Научная новизна работы связана с обнаружением у морских полихет BRICHOS-ассоциированных пептидов, относящихся к различным структурным семействам, и установлении различий в их антимикробной активности, селективности и механизмах действия. Дополнительный интерес представляют результаты направленной модификации β-шпилечных пептидов, позволившие оценить влияние отдельных аминокислотных остатков на их свойства.

Практическое значение исследования прежде всего определяется высокой активностью аналога абареницина Ap9 в отношении грамотрицательных бактерий и его эффективностью на экспериментальных моделях инфицированных мышей. Особого внимания заслуживает сохранение терапевтического действия пептида при инфекции, вызванной штаммом *E. coli*, несущим ген устойчивости к полимиксинам. Отсутствие перекрестной устойчивости и сравнительно низкая вероятность формирования бактериальной резистентности к пептиду обосновывают дальнейшее изучение Ap9 как возможной альтернативы полимиксинам. Наряду с этим, результаты, полученные для немодифицированного пептида HfBRI-25, свидетельствует о том, что среди обнаруженных природных соединений также встречаются молекулы с выраженной антибактериальной активностью и высокой селективностью действия.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Сформулированные в диссертации положения опираются на данные, полученные с использованием различных экспериментальных подходов. Отобранные по результатам биоинформатического поиска пептиды были получены и детально охарактеризованы, а выводы о перспективах их дальнейшего изучения основаны на совокупной оценке антибактериальной активности, селективности и *in vivo* эффективности. Результаты данного исследования представлены в 7 рецензируемых научных статьях,

преимущественно первого и второго квартилей, а на разработанный β-шпилечный пептид Ap9 получен патент Российской Федерации.

При общей положительной оценке диссертационной работы хотелось бы задать автору несколько вопросов, касающихся оценки полученных результатов исследования и описания использованных методических подходов.

Вопросы к диссертационной работе

1. В ходе биоинформационного анализа автором была сформирована библиотека из 82 аминокислотных последовательностей, предположительно соответствующих антимикробным пептидам, однако дальнейшая экспериментальная работа проводилась лишь с 7 молекулами. В диссертации не указаны и не обсуждаются причины, в соответствии с которыми именно эти молекулы были выбраны для дальнейшего исследования.
2. Центральным элементом в общей концепции данной работы является предположение автора о том, что поиск новых антимикробных пептидов полихет на основе идентификации консервативной последовательности (BRICHOS-домена) в структуре их белков-предшественников позволяет не только идентифицировать новые антимикробные соединения, но и открывает возможность обнаружения целых семейств новых защитных пептидов, тем самым существенно изменяя подход к поиску новых АМП у животных. Однако в диссертации не приводятся и не обсуждаются данные о том, удалось ли идентифицировать в составе сформированной библиотеки последовательности, предположительно принадлежащие антимикробным пептидам неизвестных ранее семейств.
3. Автором недостаточно подробно описаны эксперименты по конструированию рекомбинантных продуцентов антимикробных пептидов. В частности, не приводятся схема клонирования и структуры использованных при получении генов АМП праймеров.

Заключение

Диссертация Сафроновой Виктории Николаевны является завершенной научной работой и содержит новые результаты, расширяющие представления о BRICHOS-ассоциированных антимикробных пептидах и перспективах их дальнейшего изучения. Выполненное исследование «Поиск и характеристика новых BRICHOS-ассоциированных антимикробных пептидов» полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утвержденного 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 г. №1539), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия.

Официальный оппонент

Доктор химических наук, член-корреспондент РАН, профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский Технологический университет»

Костров Сергей Викторович 08.10.2026

Контактные данные:

Тел.: 89166516355 , e-mail: kostrov@img.ras.ru

Адрес места работы:

119454, Москва, Проспект Вернадского, дом 78

Подпись д.х.н. Кострова С.В.
«Удостоверяю»
Заместитель первого проректора
РТУ МИРЭА Ефимова Ю.А.