

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Всеволода Владимировича Богданова «Мембранотропные пептиды, выделенные из морских беспозвоночных и гриба *Fusarium sambucinum*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.02 – биофизика и 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Клеточная адгезия является важнейшим регуляторным фактором, определяющим ход и направленность таких биологических процессов, как пролиферация, дифференцировка клеток, морфогенез. Многие патологические процессы обусловлены нарушением межклеточных адгезионных взаимодействий. В работах научного коллектива, возглавляемого профессорами В.П. Ямсковой и И.А. Ямсковым, в течение многих лет проводятся глубокие исследования нового семейства регуляторных белков и полипептидов, первоначально обнаруженных в различных тканях позвоночных животных и способных влиять весь комплекс биологических явлений, связанных с адгезионными взаимодействиями клеток. Новое семейство биорегуляторов объединяли методы их выделения из тканей, методика очистки, методы биотестирования и изучения их специфической биологической активности, а также сходство их физико-химических свойств. Они представлены пептидами и полипептидами, часто гликозилированными, проявляющими свою активность в комплексе с различными белками-модуляторами. Оказалось, что биорегуляторы, выделенные из тканей позвоночных, характеризуются тканевой, но не видовой специфичностью, а их действие проявляется наиболее ярко в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих 10^{-8} - 10^{-15} мг белка/мл. Эти белки и полипептиды получили название «мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы» (МГТБ). В дальнейшем было обнаружено, что основные биологические процессы и явления, к которым имеют прямое отношение МГТБ животных, характерны и для многоклеточных растений, и из разных видов растений были выделены аналоги МГТБ.

Это позволяло предположить, что МГТБ представляют собой, возможно, универсальный, повсеместно распространенный в живой природе класс биорегуляторов. Чтобы получить свидетельства в пользу или против этого предположения представляло интерес выяснить присутствуют ли они в тканях беспозвоночных животных, а также более низших организмов, например, грибов. Выявление и изучение свойств таких биорегуляторов из разнообразных организмов представляет большой интерес не только с

теоретической, но и с чисто практической точки зрения, поскольку они могут быть использованы для разработки новых фармакологических препаратов и БАДов.

Целью диссертационной работы В.В. Богданова являлась идентификация новой группы биорегуляторов у некоторых беспозвоночных животных и мицеллия несовершенного плесневого гриба *Fusarium sambucinum*, их выделение, изучение их структуры, физико-химических свойств, мембранотропной и специфической активности. В свете вышесказанного высокая актуальность темы данной работы не вызывает сомнения. Важно подчеркнуть, что эта работа является пионерской – ранее попыток выделения и характеристики мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов из этих объектов не предпринималось.

Диссертация В.В. Богданова написана по традиционному плану и состоит из «Введения» и 3-х глав, включающих «Обзор литературы», главу «Материалы и методы», главу «Результаты и их обсуждение», «Заключение и выводы» и завершается «Списком литературы», включающим 141 название.

В обзоре литературы автор достаточно полно рассматривает состояние проблемы, которой посвящено исследование. Несмотря на важнейшее общебиологическое и практическое значение нового класса биорегуляторов, глубоко занимается этой проблемой пока весьма ограниченное число исследователей. И хотя ими уже получен обширный экспериментальный материал, касающийся тканево-специфических биорегуляторов, выделенных из многих источников, литература по этой проблеме немногочисленна. Обзор исследований в этой области, выполненный диссертантом, имеет, поэтому, самостоятельную ценность, поскольку позволяет читателю получить достаточно цельное представление о новом классе биорегуляторов. Первая часть обзора посвящена рассмотрению экспериментальных подходов к исследованию механизмов клеточной адгезии, и методов тестирования МГТБ. Далее подробно рассматриваются физико-химические свойства и особенности строения МГТБ и их биологическая активность, которая для многих МГТБ из животных органов и тканей носит тканево-специфический, но не видово-специфический характер. В обзоре кратко рассматриваются свойства МГТБ из различных видов растений, которые обладают сходными с МГТБ позвоночных животных физико-химическими свойствами и характером действия как на животные, так и на растительные организмы. Обсуждаются данные о внеклеточной локализации МГТБ как животного, так и растительного происхождения, что согласуется как с методами их экстракции из тканей, так и с характерной для них мембранотропной и адгезионной активностями.

Интересной особенностью всех биорегуляторов этой группы является то, что они оказывают свое действие в сверхмалых дозах (СМД), т.е. при разведениях, при которых расчетные действующие «концентрации» биорегуляторов в тест-системах могут составлять величины порядка 10^{-15} мг/мл и ниже, а в пересчете на молярные концентрации – величины порядка 10^{-18} М. Было также обнаружено, что в растворах они способны к образованию наночастиц с размерами достигающими сотен нанометров. Отсюда следует, что расчетные концентрации биорегуляторов в тест-системах настолько низки, что объяснить их действие, основываясь на стандартных представлениях химии и биохимии, в частности, закона действующих масс, весьма проблематично. Автор уделяет этой проблеме особый раздел своего обзора, в котором приводит ссылки на новейшие работы, посвященные исследованию особых свойств водных систем, полученных путем многократного последовательного разведения исходных растворов БАВ. Среди этих исследований особенно выделяются работы группы академика А.И. Коновалова, в которых показано, что в растворах веществ в СМД присутствуют частицы с размерами, достигающими многих сотен нанометров, что для их появления требуется наличие природного электромагнитного поля. В отсутствие поля эти частицы не формируются и сверх-высокие разведения БАВ не проявляют биологической активности. Автор отмечает, что эти новые данные об особых свойствах водных систем позволяют наметить путь к пониманию биологических механизмов действия БАВ и, в частности, МГТБ в сверх-малых дозах.

С моей точки зрения, в обзоре следовало бы уделить внимание тем биологическим системам, которые послужили объектом исследования автора в его диссертационной работе, в частности, обосновать выбор этих беспозвоночных животных и гриба *Fusarium s.* для выделения из них МГТБ. И хотя описание объектов исследования дается в главе *Результаты и их обсуждение*, к сожалению, и там я не смог найти обоснования выбора гепатопанкреаса краба и гриба. Еще одно замечание к обзору литературы – слишком лаконичное описание основных методов тестирования МГТБ (стр. 17), которое не позволило, по крайней мере мне, понять разницу между двумя методами изучения мембранотропной активности биорегуляторов.

Для решения основных задач диссертационной работы В.В. Богданов применил обширный и разнообразный набор методов. Не часто можно встретить диссертационную работу, автор которой демонстрирует профессиональное владение комплексом методов выделения и очистки биоорганических соединений и самых современных методов физико-химического анализа их свойств, при этом показывает владение методами выращивания культур тканей и клеток, методами гистологии, умение работать с подвергнутыми хирургическим операциям животными. Мое замечание к этому разделу – не описана

процедура приготовления растворов исследуемых веществ в СМД, поскольку, как известно, от способа их получения зависит то, в какой степени они будут проявлять биологическую активность. Следует отметить, что биорегуляторы, обладающие мембранотропным действием, выделяли из четырех разных объектов. С учетом того, насколько комплексным было исследование свойств МГТБ из каждого объекта, автор представил выполнил громадный объем экспериментальной работы.

Как следует из главы «Результаты и их обсуждение», были изучены мембранотропные эффекты экстрактов, полученных из всех источников, осадков и супернатантов после высаливания экстрактов сульфатом аммония. Для всех этих образцов была определена концентрационная зависимость их действия для очень широкого диапазона разведений и установлено, что все супернатанты могут проявлять свое мембранотропное действие в СМД вплоть до расчетных концентраций 10^{-14} мг/мл. Учитывая, что разработанный ранее в лаборатории адгезиометрический метод тестирования мембранотропных эффектов является достаточно тонким и трудоемким, следует высоко оценить трудолюбие и тщательность работы диссертанта.

В супернатантах всех исследованных объектов методом лазерной корреляционной спектроскопии обнаружены частицы со средним диаметром в зависимости от конкретного объекта от 150 до 350 нм. К сожалению, автор не приводит концентрацию белка в анализируемых эти методом супернатантов и не исследовал, присутствуют ли такие частицы в разведениях супернатантов до СМД, в частности, проявляющих биологическую активность. А это позволило бы провести сравнение свойств растворов МГТБ в СМД с растворами, исследованными в группе акад. А.Н. Коновалова.

Большая работа проведена по фракционированию супернатантов методом обратно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила и исследованию молекулярного состава полученных фракций и их мембранотропной активности. Показано, что далеко не во всех фракциях, содержащих пептиды, обнаруживается биологическая активность, но она может проявляться в их смеси и исчезать при объединении фракций и осадка, полученного при высаливании экстракта сульфатом аммония. Вообще говоря, результаты, полученные при фракционировании супернатантов методом ВЭЖХ нелегко интерпретировать. Мне осталось неясным, почему, например в супернатанте гепатопанкреаса краба по данным метода MALDI-TOF масса самого небольшого молекулярного иона составляет 2824 Да, а остальные превышают 4000 Да, а после хроматографии масса самых больших ионов едва достигает 2000 Да, а у остальных она существенно ниже. При исследовании мембранотропной активности экстрактов и супернатанта ее наличие нелинейным образом зависело от степени разведения – обнаруживалось в одних и отсутствовало в других

разведениях. А какие разведения отдельных фракций после хроматографии использовали для тестирования их МА? Может быть взяты были такие разведения, которые неактивны, а если бы были использованы более низкие или высокие разведения, они бы обнаружили активность? Кроме того, ряд фракций, полученных после хроматографии, мог содержать ацетонитрил. Избавлялись ли от него, а если нет, проверяли ли, как он влияет на мембранотропную активность, например, цельного супернатанта? К сожалению ответа на эти вопросы в диссертации я не нашел. Помимо прочего, результаты хроматографических экспериментов оформлены и обсуждены не слишком тщательно. На хроматограммах супернатантов экстрактов жемчужницы и мидий отсутствуют профили градиента ацетонитрила, «слепые» подписи по осям. Поэтому утверждения автора о выходе активных фракций в начале градиента проверить трудно.

Наиболее практически важными результатами исследования, проведенного В.В. Богдановым являются результаты, полученные при исследовании гепатопротекторного действия новых МГТБ на модели печени тритона, CCl_4 -индуцированного фиброза печени крыс и ранозаживляющего действия на модели экспериментальной кожной раны у мышей. Было установлено, что МГТБ из гепатопанкреаса краба, а также культуральной среды гриба *Fusarium sambucinum* оказывают гепатопротекторное действие на печень тритона и на процесс фибротических изменений печени крысы при ее отравлении CCl_4 . При этом особенно важно то, что эти биорегуляторы, особенно МГТБ из гепатопанкреаса даже в отличие от МГТБ из печени крысы препятствовали развитию фиброза с самого начала отравления. К сожалению, в диссертации не приведено данных о дозах биорегуляторов, которые получали крысы, а также о частоте их введения.

Интересно также, что препарат, выделенный из пресноводной жемчужницы, в отличие от препарата, выделенного из мидии, гепатопанкреаса краба, культуральной среды *Fusarium sambucinum* способствовал полной реэпителизации области раны и стимуляции ее заживления. Автор связывает такую биологическую активность МГТБ жемчужницы с тем, что ранозаживляющее действие оказывают ее личинки – глохидии, способные на определенной стадии своего жизненного цикла стимулировать рост эпителия. Это - интересное и вполне правдоподобное предположение. Результаты, полученные при исследовании биологического действия МГТБ из беспозвоночных и культуральной среды гриба *Fusarium sambucinum* являются весьма перспективными для разработки фармакологических препаратов и БАД для профилактики и лечения соответствующих патологий.

Практически все полученные В.В. Богдановым результаты являются новыми, поскольку ранее никто не исследовал выделенные из тканей беспозвоночных и

несовершенного гриба биорегуляторы, обладающие мембранотропным действием. Представленные в диссертации результаты позволяют сравнивать друг с другом физико-химические и биологические свойства мембранотропных биорегуляторов, выделенных из разных биологических объектов. В.В. Богдановым было показано, что общим для всех биорегуляторов группы МГТБ является то, что они растворимы в насыщенном растворе сульфата аммония, что в их состав входят биологически активные полипептиды, что в водных растворах они присутствуют в виде частиц размерами в сотни нанометров и что их мембранотропная активность характеризуется полимодальной дозовой зависимостью и проявляется в концентрациях, соответствующих 10^{-4} - 10^{-14} мг белка/мл.

Следует отметить, что эффекты изученных биорегуляторов на данных животных моделях сходны с теми, что оказывают на них биорегуляторы, выделенные из тканей животных, что подтверждает отсутствие видоспецифичности в мембранотропном действии нового класса биорегуляторов.

Высказанные выше замечания и вопросы к диссертации порождены обширным фактическим материалом диссертации и ни в коей мере не умаляют ценности как представленной на защиту работы, так и сделанных выводов.

В целом диссертация представляет собой законченную научно-исследовательскую работу. Впервые в тканях беспозвоночных животных и в микроскопических грибах обнаружены новые биорегуляторы, которые по характеру мембранотропного действия и ряду физико-химических свойств проявляют сходство с МГТБ позвоночных животных и растений. На основе широкого круга освоенных автором методов и выполненных принципиально новых экспериментальных исследований обнаружено, что эти биорегуляторы достоверно влияют на широкий круг биологических процессов как *in vitro*, так и *in vivo*, в разнообразных тест-объектах. Примечательно, что это действие они оказывают в диапазоне сверхмалых доз. Поставленные автором цели диссертационной работы выполнены. При этом, что особенно важно, работа открывает новые перспективы исследований в этом увлекательном и актуальном направлении.

Автореферат и публикации полностью отражают материалы работы. Три статьи с материалами диссертации опубликованы в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень Высшей аттестационной комиссии. Диссертационный материал неоднократно докладывался на ведущих российских и международных конференциях.

Таким образом, диссертационная работа «Новые адгезивные биорегуляторы растительного происхождения» отвечает требованиям, установленным пунктами 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 23 сентября 2013 года, с изменениями Постановления

Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года, в редакции Постановления Правительства РФ № 748 от 02 августа 2016 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор диссертации – В.В. Богданов, безусловно, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика и по специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

Профессор кафедры биоорганической химии

Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова,

доктор биологических наук, доцент

Воейков Владимир Леонидович

Адрес: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы,

д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ.

Телефон рабочий: +7 495 939 1268

E-mail: v109028v1@yandex.ru

Подпись доктора биологических наук В.Л. Воейкова заверяю:

ректор биол. ф-та МГУ, академик РАН Кирилл Юрьевич

дата

09.11.2017

