

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии»
Российской академии наук»
119071, Москва, Ленинский пр-т, 33, стр. 2
Тел. 954-52-83, факс: 954-27-32
10.11.2017 № 0007-2171-785
на № _____

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор

Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,

член-корреспондент РАН



В.О. Попов

2017 г.

ОТЗЫВ

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

Процессы межклеточной адгезии играют важную роль в обеспечении целостности живых организмов, регенерационном восстановлении органов и тканей. Показано, что в обеспечение адгезионных взаимодействий, наряду с собственными поверхностными элементами клеточных структур, существенный вклад вносят внеклеточные пептидно-белковые комплексы. В рамках исследований тканей печени и глаза млекопитающих подробно охарактеризованы такие мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ), представляющие собой крупные наноразмерные агрегаты. Отмечено, что взаимодействия МГТБ с клеточными поверхностями характеризуются высокой тканеспецифичностью при низкой видовой специфичности. Показана эффективность применения МГТБ-содержащих препаратов как терапевтических средств для восстановления травмированных и патологически измененных тканей.

При этом физиологическое действие наблюдается при использовании МГТБ в крайне низких концентрациях, что обуславливает дополнительный интерес к выяснению механизмов их действия. Помимо высших животных, МГТБ обнаружены у ряда растений. Однако представленность МГТБ у различных систематических групп живых организмов, особенности МГТБ, обусловленные их происхождением, охарактеризованы очень слабо. В этом отношении особый интерес представляет характеристика МГТБ или МГТБ-подобных компонентов у низших позвоночных, межклеточные взаимодействия у которых существенно отличаются. На сегодняшний день данный круг объектов, крайне интересный с фундаментальной и перспективный с практической точки зрения, остается малоизученным.

С учетом вышеизложенного не вызывает сомнения **актуальность** диссертационной работы В.В. Богданова, направленной на выявление и характеристику пептидов с МГТБ-подобным действием в тканях морских беспозвоночных и в культуральной среде плесневого гриба.

Диссертационная работа, описывающая результаты проведенного исследования, свидетельствует об успешном решении диссертантом поставленных задач – выявлении новых пептидов с МГТБ-подобным действием, подтверждении их гепатопротекторного и ранозаживляющего действия. В диссертации представлены результаты проведенного исследования, подробная характеристика новых пептидов и процедур их выделения, описание новых методик для тестирования МГТБ препаратов. Работа В.В. Богданова изложена на 134 страницах машинописного текста, включает 36 рисунков и 11 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, выводов и библиографии (141 ссылка).

Во введении обосновываются актуальность работы и ее научная новизна, формулируются цели и задачи исследования, дается оценка практического значения полученных результатов, личного вклада автора, формулируются основные положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о представлении (апробации) основных положений диссертационной работы на научных мероприятиях, числе публикаций по теме диссертации, финансовой поддержке исследования, объеме и структуре диссертации.

В первой главе представлен обзор литературы по теме исследования, об апробации работы, включающий формулировку и обоснование концепции МГТБ,

изложение результатов исследований по строению, физико-химическим свойствам и биологической активности ранее изученных МГТБ. Диссертант описывает основные методические подходы, используемые при изучении процессов клеточной адгезии, детально характеризует экспериментальные модели, на которых тестируются регуляторы межклеточных взаимодействий. Представлены сведения по изучению пептидных и белковых соединений, проявляющих мембранотропную активность и обеспечивающих регулируемые процессы межклеточной адгезии. Рассматриваются особенности их состава, стабильность в различных условиях, формирование наноразмерных агрегатов, функционирующих в живых организмах. Обсуждаются закономерности селективного действия МГТБ, их влияние на различные физиологические процессы, способы исследования специфической активности МГТБ. Представлено разнообразие источников, из которых были выделены и охарактеризованы препараты МГТБ. Рассматриваются возможности изучения МГТБ с использованием препаратов ткани печени, анализируются преимущества использования в этих работах различных организмов. Отдельно комментируются возможности использования специфических МГТБ в офтальмологических работах. Представлен массив данных по изучению растительных компонентов с МГТБ-активностью, обсуждаются закономерности их дозозависимого действия. В заключении обзора автор суммирует существующие представления о механизмах, лежащих в основе биологической активности МГТБ, и факторах, обуславливающих их эффективность при использовании в сверхмалых дозах. Данная систематизация позволяет диссертанту дать общую оценку МГТБ, выделить нерешенные вопросы и тем самым аргументированно определить цель и задачи исследования.

В целом обзор литературы, подготовленный В.В. Богдановым, интегрирует наиболее важные публикации по проблематике диссертации, включая работы последних лет, и формирует необходимую основу для оценки представляемых далее результатов собственных исследований. Обзор хорошо структурирован, представленный материал четко и корректно изложен. Данная глава диссертации свидетельствует о высокой научной квалификации соискателя.

Во второй главе «Материалы и методы» представлены реактивы, приборы и экспериментальные методики, использованные автором при проведении работ. В.В. Богдановым освоены и успешно применены методы получения тканевых экстрактов из гепатопанкреаса краба, глохидий жемчужницы, тканей мидий, культуральной

среды гриба *Fusarium sambucinum*, электрофореза белков, регистрации кругового дихроизма, лазерной корреляционной спектроскопии, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Для изучения МГТБ реализованы методики адгезиометрического определения мембранотропной активности, роллерного культивирования животных клеток, приготовления и микроскопического анализа гистологических срезов, морфометрии ткани печени крыс, анализа заживления кожных ран у мышей. Данный комплекс методов выбран в полном соответствии с решаемыми задачами, позволяет получать наиболее информативные результаты и эффективно характеризовать как структурные свойства, так и биологическую активность МГТБ.

Материалы второй главы диссертации отражают высокую экспериментальную квалификацию соискателя и владение им современными биофизическими и биотехнологическими методами.

Третья глава диссертации включает изложение полученных результатов и их обсуждение. Рассмотрены циклы экспериментов по выделению МГТБ, изучению их специфической биологической активности, оценке эффективности препаратов МГТБ в системах роллерного органотипического культивирования ткани печени тритона, экспериментального фиброза печени крыс и заживления экспериментальной кожной раны у мышей. Представленные сведения отражают полноту проведенного исследования и успешность реализации поставленных задач. Диссертантом в тканях беспозвоночных животных и культуральной среде гриба *Fusarium sambucinum* обнаружены пептиды, сходные с МГТБ из тканей млекопитающих и растений. Осуществлено выделение МГТБ-препаратов, характеристика их состава и структурной формы. Показано, что данные пептиды проявляют репарирующее действие на ткани в экспериментальных моделях патологий, сопоставимое с ранее описываемыми МГТБ. Охарактеризованы концентрационные зависимости биологического действия новых МГТБ-препаратов, тканевая специфичность их биологического действия на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Представленные в диссертации эксперименты корректно спланированы и реализованы. Достоверность полученных результатов подтверждается их воспроизводимостью, охарактеризованной стандартными статистическими методами. Результаты работы согласуются с существующими представлениями о МГТБ, их структуре и биологическом действии, подтверждая применимость общих

закономерностей для новых объектов. Таким образом, обоснованность и достоверность сформулированных в диссертации положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнения.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется установленным присутствием мембранотропных пептидов, сходных по свойствам с МГТБ, в тканях беспозвоночных животных и в микроскопических грибах, свидетельствующим об универсальности механизмов регуляции межклеточной адгезии. Диссертантом показано гепатопротекторное и ранозаживляющее действие характеризуемых МГТБ-препаратов. Установлено, что МГТБ, выделенные из тканей беспозвоночных животных, эффективно действуют на ткани позвоночного животного. Результаты исследования существенно расширяют теоретические представления о механизмах межклеточной адгезии и ее регуляторах.

Значимость для развития биофизики и биотехнологии выполненного исследования определяется разработкой новых экспериментальных моделей для экспресс-тестирования гепатопротекторной активности веществ, выявленными возможностями применения отходов переработки промышленных беспозвоночных для получения востребованных биологически активных препаратов. Предложенный диссертантом методический инструментарий может быть эффективно использован при дальнейшем изучении разнообразия МГТБ в живых организмах.

Все представленные в диссертационной работе результаты являются новыми, работа В.В. Богданова полностью оригинальна. В работе охарактеризованы ранее не изучавшиеся структуры с МГТБ-активностью, формируемые в результате жизнедеятельности беспозвоночных животных и грибов, предложены оригинальные методы тестирования биологического действия препаратов МГТБ.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. При описании методик обработки микроскопических изображений указывается (стр. 48 диссертации), что «для каждой экспериментальной точки просчитывали не менее 30 срезов, полученные массивы данных проверялись на нормальность распределения, в отсутствие которой для статистической обработки использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и бутстреп-анализ». Выбранный математический инструментарий вполне корректен, однако представляемые далее в разделе «Результаты и обсуждение» значения

ограничиваются средней величиной и среднеквадратичным отклонением. Какое именно число срезов обрабатывалось для получения представленных данных и в какой степени получаемые величины удовлетворяли нормальным распределениям, диссертант не указывает.

2. Отметим также, что в тексте диссертации не дается объяснений того, почему для сравнительной характеристики нескольких препаратов – см. таблицу 7, 10, 12 автореферата – используются именно указанные дозы. Являются ли они минимальными, обеспечивающими статистически достоверный эффект? Или дозы выбирались по каким-то иным критериям?

3. Включение в раздел «Результаты и обсуждение» подробного описания гепатопанкреаса краба (стр. 52-53), биологии мидий (стр. 63-65) и грибов *Fusarium* (стр. 74-76) вряд ли оправдано. Рассмотрение этих данных в заключительной части литературного обзора было бы полезно для обоснования предлагаемого общего плана и задач исследования.

4. Для обсуждения механизмов сборки и потенциального применения описанных автором МГТБ-комплексов крайне важно, содержат ли они компоненты не белковой природы. Ответ на этот вопрос представляется значимым для дальнейшего развития работы.

Вышеизложенные соображения носят частный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

Апробация работы. Основные результаты отражены в 9 статьях, включая 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и в 3 тезисах докладов. В 2010-2016 гг. исследование было представлено на 15 научных мероприятиях. Опубликованные работы и автореферат в полной мере отражают выполненную работу, представляют ее результаты и выводы.

Тематически диссертационная работа В.В. Богданова полностью соответствует научным специальностям 03.01.02 – биофизика, 03.01.06 – биотехнология (в том числе нанобиотехнологии).

Результаты и выводы диссертации могут быть рекомендованы к использованию в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова (биологический факультет и факультет фундаментальной медицины), Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Федеральном исследовательском центре

«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биохимии им. А.Н. Баха), Институте физиологически активных веществ РАН (Черноголовка), Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (Владивосток), Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Институт регенеративной медицины), Национальном медицинском исследовательском центре им. В.А. Алмазова МЗ РФ (Санкт-Петербург). С учетом необходимой дальнейшей комплексной характеристики биологического действия исследованных в работе препаратов они могут рассматриваться как компоненты новых терапевтических средств. Важное значение имеет также применение предложенных новых методов тестирования МГТБ для оценки аналогичных соединений, выделяемых из других источников.

Знакомство с диссертацией, авторефератом и публикациями соискателя подтверждает, что В.В. Богдановым выполнено законченное научное исследование высокого теоретического и экспериментального уровня, которое соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов. Диссертация В.В. Богданова представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития биофизики и биотехнология (в том числе нанобиотехнологии) – выявлены мембранотропные пептиды в тканях ряда беспозвоночных животных и в культуральной среде плесневого гриба, показано их участие в процессах межклеточной адгезии, гепатопротекторное и ранозаживляющее действие.

Диссертационная работа «Мембранотропные пептиды, выделенные из морских беспозвоночных и гриба *Fusarium sambucinum*» соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении учёных степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями согласно Постановлениям Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.09.2017 г. № 1024). Автор диссертации, Всеволод Владимирович Богданов, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.02 – биофизика, 03.01.06 – биотехнология (в том числе нанобиотехнологии).

Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании лабораторий иммунобиохимии и химической энзимологии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, основное направление научно-исследовательской деятельности которых соответствует тематике диссертации. На заседании присутствовало 16 человек. Результаты голосования: «за» – 16 человек, «против» – нет, «воздержалось» – нет. Протокол заседания № 12 от 9 ноября 2017 г. Составитель отзыва – заведующий лабораторией иммунобиохимии Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, доктор химических наук, профессор Дзантиев Борис Борисович.



Дзантиев Б.Б.
10 ноября 2017

Б.Б. Дзантиев

«10» ноября 2017 г.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория иммунобиохимии.

Почтовый адрес: ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия.

Телефон: (495)954-31-42.

Адрес электронной почты: dzantiev@inbi.ras.ru