

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 99.0.027.03,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ РОССИЙСКОГО ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ТВЕРСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМЕНИ
Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело

№ _____

решение диссертационного
совета

от «27» февраля 2024 года № 2

О присуждении Насибову Элвину Мубариз оглы, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите «19» декабря 2023 года (протокол № 13) диссертационным советом 99.0.027.03, созданным на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной технической университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук (125047, Москва, Миусская площадь, 9, приказ о создании диссертационного совета от «28» сентября 2016 года №1172/нк).

Соискатель Насибов Элвин Мубариз оглы, «31» августа 1996 года рождения, в 2019 году окончил Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. В 2023 году освоил программу подготовки научных и научно-педагогических кадров в аспирантуре Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

Работает научным сотрудником отдела медико-биологических проблем Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Диссертация выполнена в отделе медико-биологических проблем Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор Никитина Зоя Кимовна, главный научный сотрудник отдела медико-биологических проблем Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений.

Официальные оппоненты.

Шилов Илья Александрович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией анализа генов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»;

Осмоловский Александр Андреевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (Москва), в своем **положительном** отзыве, подписанном доктором фармацевтических наук, доцентом, заведующим кафедрой общей фармацевтической и биомедицинской технологии, Суслиной Светланой Николаевной, указала, что диссертация Насибова Элвина Мубариз оглы на тему «Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов» является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача по созданию биотехнологических продуцентов для получения коллагенолитических ферментов, и полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Насибов Элвин Мубариз оглы – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология (отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры общей фармацевтической и биомедицинской технологии медицинского института «19» января 2024 года, протокол №6)

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 18 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 5 работ. Общий объем публикаций составляет 157 страниц. **В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах.** Все работы опубликованы в соавторстве, личный вклад соискателя составляет не менее 85% и состоит в разработке концепции исследования, постановке задач, выполнении исследования и интерпретации полученных результатов. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на международных и всероссийских научных конференциях и форумах; монографий и депонированных рукописей соискатель не имеет.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Никитина З.К., Гордонова И.К., Насибов Э.М. Изучение протеолитической и коллагенолитической активности мицелиальных грибов в процессе глубинного

культивирования // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022. Т. 25, № 9. С. 16-20. (CAS)

2. Никитина З.К., Насибов Э.М., Гордонова И.К., Савин П.С. Влияние условий культивирования *Aspergillus fumigatus* на секрецию коллагенолитических протеаз // Технологии живых систем. 2023. № 20(2). С. 5-17. (CAS)

3. Насибов Э.М., Никитина З.К. Получение и свойства коллагенолитической протеиназы *Aspergillus fumigatus* // Химико-фармацевтический журнал. 2023. Т. 57(7). С. 14-19. (Web of Science, Scopus)

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов, **все положительные**. В отзывах указывается, что представленная к защите диссертационная работа характеризуется высокой актуальностью, научной ценностью и имеет большое значение для теории и практики развития биотехнологии в Российской Федерации. Отзывы направили:

1. Лобанок Анатолий Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, главный научный сотрудник лаборатории ферментов Государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси». Отзыв содержит замечания: уместной была бы в автореферате диссертации информация о продуктивности синтеза протеиназы коллагенолитического действия другими известными в литературе микроорганизмами; в тексте встречаются отдельные стилистические погрешности.

2. Карпова Регина Васильевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунофармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина». Без замечаний.

3. Семенова Елена Федоровна, кандидат биологических наук, профессор кафедры фармации Института биохимических технологий, экологии и фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского». Без замечаний.

4. Чередниченко Михаил Юрьевич, кандидат биологических наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева». Отзыв содержит вопросы и замечания: (1) В чем автор видит практическое приложение полученных результатов? (2) Автор использует при представлении данных в качестве статистического показателя стандартное отклонение σ при $p \leq 0.05$. При оценке различий между выборками на этом уровне значимости необходимо «откладывать» от арифметической средней 2σ . Автору следует быть осторожным в оценке различий между выборочными средними.

5. Сухосырова Елена Александровна, кандидат биологических наук, руководитель отдела микробиологических и вирусологических исследований Общества с ограниченной ответственностью «ОЛФАРМ». Без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в данной области биотехнологии, что подтверждается наличием соответствующих публикаций в ведущих научных рецензируемых изданиях, а также спецификой и профилем диссертационной работы, и

выполнены в соответствии с пп. 23 и 24 «Положения о присуждении научных степеней» (Постановление Российской Федерации от 24.09.13 № 842 в действующей редакции).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: предложены критерии и схема поиска микроорганизмов-продуцентов коллагенолитических протеаз; определены скорости роста и индексы лизиса коллагена 47 коллекционных штаммов микромицетов, охарактеризованы их коллагенолитические свойства; выбран новый перспективный штамм *Aspergillus fumigatus*, секретирующий коллагенолитические протеазы при глубинном культивировании; показано, что на биосинтетическую активность и параметры роста гриба влияет ряд факторов: количественный и качественный состав питательной среды, посевного материала, время культивирования, пассирование продуцента на средах с индуктором (коллагеном); разработаны условия культивирования микромицета при глубинной и твердофазной ферментации; предложен метод выделения и очистки протеазы из культуральной жидкости, позволивший получить электрофоретически гомогенный препарат, изучены его физико-химические свойства; проведен анализ жизнеспособности и коллагенолитической активности микромицетов при различных способах консервации.

Теоретическая значимость исследований обусловлена тем, что: применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс существующих базовых микробиологических, биохимических, физико-химических методов исследования, обеспечивших получение новых теоретических данных об активации биосинтетических процессов микроорганизмов; обосновано применение комплекса показателей для выбора микромицетов-продуцентов коллагенолитических протеаз; обосновано использование пассирования биообъекта на средах, содержащих субстрат фермента, в качестве способа для увеличения синтеза и секреции целевого продукта; получены зависимости изменения секреции коллагенолитических протеаз от времени глубинного и твердофазного культивирования; проведена модернизация методических подходов, обеспечивающих выделение и очистку коллагенолитических протеаз.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: обоснованы критерии для выбора микромицетов, обладающих коллагенолитической активностью и найден новый штамм-продуцент коллагенолитических протеаз; определены составы питательных сред и условия культивирования при глубинном и твердофазном культивировании гриба, что позволяет масштабировать процесс получения ферментов; предложен вариант усовершенствования культуры *Aspergillus fumigatus* как продуцента коллагенолитических протеаз; предложен и внедрен новый метод выделения и очистки фермента, что позволяет приступить к созданию новых лекарственных средств на его основе; внедрены способы консервации продуцента, обеспечивающие сохранение его жизнеспособности и коллагенолитической активности; разработаны биотехнологические процессы, определяющие основные лабораторные этапы технологии получения коллагенолитической протеазы, что обеспечивает возможность перехода к производству фермента на предприятиях микробиологической и фармацевтической промышленности, инженерной энзимологии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- результаты получены на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;
- теория построена на известных проверяемых данных, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;
- достоверность полученных результатов обеспечена использованием современных методов эксперимента, соответствующих современному научному уровню;
- выводы диссертации обоснованы, не вызывают сомнения и согласуются с современными подходами к выбору объектов и методов.

Личный вклад соискателя состоит в участии на всех этапах процесса поиска и анализа научной литературы, постановке основных задач исследования, проведении всех экспериментов и получении исходных данных, обработке и интерпретации экспериментальных результатов, подготовке основных публикаций по выполненной работе.

В ходе защиты диссертации были заданы **следующие вопросы:**

1. Каким образом было доказано наличие коллагенолитических ферментов у исследуемых микроорганизмов?
2. В работе Вы использовали два метода определения протеолитической активности с использованием казеина и коллагена I типа. Могут ли эти методы служить для определения присутствия коллагеназ?
3. В процессе очистки фермента из культуральной жидкости у Вас описано снижение суммарной активности до 52% от первоначальной. С чем это связано?
4. Не определяли ли Вы в работе, как действуют другие протеазы, например трипсин, на коллаген?
5. В диссертации Вы пишете о возможности масштабирования процесса культивирования. Как это осуществлялось?
6. Какие носители использовались при проведении твердофазного культивирования? Не было ли в процессе культивирования повышения температуры?
7. В Вашем институте в 2002 году была выполнена работа Сухосыровой Е.А. по схожей тематике. Что нового получено Вами?
8. В диссертации показано, что активность секретируемых коллагенолитических протеаз возрастает при введении в питательную среду коллагена. С чем связана эта активация?
9. При поверхностном культивировании Вы использовали в качестве показателя ферментативной активности культур индекс лизиса. Почему?
10. В диссертации вы иногда использовали термин «погруженное культивирование». Что он обозначает?
11. Вы использовали метод хранения микромицетов на агаризованных средах. В чем преимущества данного метода?
12. Получили ли вы фермент в чистом виде, и какие у него свойства?
13. Предполагаете ли вы в дальнейшем использовать найденный вами продуцент для получения фермента?
14. Для получения каких лекарственных препаратов и лекарственных форм планируется в дальнейшем использовать полученный фермент?
15. Каков механизм действия коллагеназ в качестве лекарственного средства?

16. В вашей работе показано, что некоторые культуры в процессе четырех лет хранения увеличивают в 2-3 раза целевую активность. С чем это может быть связано, и не планируете ли вы в дальнейшем более подробно изучить эти микроорганизмы?

17. Найденный вами штамм-продуцент не обладает высоким индексом лизиса коллагена, а продуктивность у него высокая. С чем это связано?

Соискатель Э.М. Насибов ответил на заданные ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию.

На первый вопрос автор пояснил, что для определения коллагенолитической активности грибов использовали поверхностное культивирование на средах с заменой сахарозы на коллаген, фиксируя рост микроорганизмов и образование зон лизиса коллагена. Кроме того, при проведении глубинного культивирования в фильтрах или фугатах культуральной жидкости, а также на каждом этапе очистки фермента определялась коллагенолитическая активность в процессе проведения ферментативной реакции исследуемого раствора с белком.

На второй вопрос автор ответил, что в работе использовали два общепринятых и описанных в литературе метода определения протеолитической активности. При этом при использовании в качестве субстрата ферментативной реакции казеина определяется общая протеолитическая активность, а при использовании коллагена – коллагенолитическая активность.

На третий вопрос автор уточнил, что для очистки коллагенолитической протеазы из культуральной жидкости продуцента использовали разработанные варианты традиционных хроматографических процедур, которые, судя по имеющимся в литературе данным, могут приводить к некоторым потерям ферментативной активности за счет неспецифической сорбции материала на сорбентах, разведении и концентрации элюентов и т.д. В то же время выход фермента в процессе очистки, полученный в нашей работе, сопоставим с результатами, приведенными в других работах об очистке коллагеназ.

На четвертый вопрос автор ответил, что в представленной работе действие трипсина на коллаген не изучали. Однако оно многократно исследовано другими авторами и показано отсутствие гидролиза коллагена протеолитическими ферментами.

На пятый вопрос автор описал, что в работе проводили пилотное культивирование гриба-продуцента в двухлитровом ферментере. При этом показано, что удельная скорость роста и коллагенолитическая активность не отличалась от результатов, полученных при культивировании в малых объемах в колбах.

На шестой вопрос автор ответил, что при твердофазном культивировании в качестве носителей использовали вермикулит и шрот цветков пижмы. В процессе культивирования поддерживали температуру на определенном уровне.

На седьмой вопрос автор объяснил, что знаком с работами, которые проводились в институте ранее, и в тексте диссертации ссылается на них. Однако по сравнению с этими работами в представленной диссертации выполнены новые исследования и получены новые результаты: проведен скрининг 47 штаммов из коллекции микромицетов института; разработаны новые способы консервации продуцентов с помощью криоконсервации и лиофилизации, а также новая схема выбора перспективных продуцентов; найден новый штамм, коллагенолитическая активность которого значительно выше ранее описанного; изучено влияние разных факторов на

коллагенолитическую активность продуцента (качественный и количественный состав белков и углеводов в питательной жидкости и посевного материала, способ инокуляции и т.д.); проведено масштабирование процесса культивирования с использованием ферментера; изучена секреция коллагенолитических протеаз при твердофазном культивировании микромицета-продуцента.

На восьмой вопрос автор уточнил, что чаще всего синтез вторичных метаболитов у микроорганизмов происходит в ответ на введение индукторов, в данном случае – субстрата ферментативной реакции (коллагена). Поэтому при введении в питательные среды белка происходит активация секреции ферментов.

На девятый вопрос автор обозначил, что индекс лизиса рассчитывают как отношение площади лизиса коллагена к площади колонии. Площадь колонии пропорциональна биомассе, а площадь зоны лизиса – активности секретируемых протеаз. Таким образом, индекс лизиса в определенной мере отражает удельную активность и позволяет оценить протеолитические свойства микроорганизмов.

На десятый вопрос автор, частично соглашаясь с замечанием, пояснил, что чаще всего в русскоязычной литературе используется термин «глубинное культивирование», однако при описании культивирования грибов ряд авторов в литературе используют термин «погруженное культивирование» в качестве синонима. Этот термин иногда был использован и в представленной работе.

На одиннадцатый вопрос автор объяснил, что в работе использовали один из методов консервации микромицетов – хранение на агаризованных средах Чапека-Докса под вазелиновым маслом при 4 °С. К достоинствам метода относится его простота, доступность, возможность после консервации быстро нарастить культуру. Показано, что этот метод дает возможность сохранить жизнеспособность и коллагенолитическую активность в течение 4 лет у всех музейных культур.

На двенадцатый вопрос автор ответил, что в процессе очистки получена коллагенолитическая протеаза в электрофоретически гомогенном состоянии. Изучение физико-химических и биохимических свойств фермента показало, что это термолабильная, нейтральная протеаза серинового типа с молекулярной массой около 40 кДа

На тринадцатый вопрос автор уточнил, что в планах стоит проведение работ по дальнейшему масштабированию процесса ферментации и получению фермента.

На четырнадцатый вопрос автор обозначил, что, прежде всего, планируется разработка новых препаратов для лечения ран, ожогов, пролежней, рубцов, келоидов. Основными лекарственными формами, по-видимому, будут мази, гели, аппликационные лекарственные формы.

На пятнадцатый вопрос автор отметил, что коллаген составляет около 30% всех белков человека и животных, являясь основой соединительной ткани. Поэтому при всех патологических процессах, связанных с излишней или нарушенной продукцией белка, перспективно использование лекарственных препаратов на основе коллагенолитических протеаз.

На шестнадцатый вопрос автор объяснил, что факт значительного увеличения коллагенолитической активности некоторых микромицетов при хранении в стандартных условиях был обнаружен впервые и нуждается в дальнейшем изучении, которое не входило в задачи настоящего исследования.

На семнадцатый вопрос автор ответил, что при отборе перспективных штаммов использована схема, учитывающая индекс лизиса и скорость роста культур. Выявленный штамм-продуцент действительно не обладал значительным индексом лизиса, однако у него были отмечены высокие скорости роста. При этом указанные показатели были получены при поверхностном культивировании, а данные о продуктивности фиксировались при глубокой ферментации.

На заседании «27» февраля 2024 года диссертационный совет за решение научной задачи по разработке биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов, имеющей существенное значение для развития биотехнологии, принял решение присудить Насибову Элвину Мубариз оглы ученую степень кандидата биологических наук.

Диссертация соответствует пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в действующей редакции). По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология по направлению исследования 2. «Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии. Технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных». Результаты работы могут быть рекомендованы для изучения и внедрения в научных и образовательных организациях, а также на промышленных предприятиях микробного синтеза фармацевтических препаратов инженерной энзимологии.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 17 докторов наук по научной специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17 (семнадцать), против – 1 (один), недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета

Виктор Иванович Панфилов

Ученый секретарь диссертационного совета

Ирина Васильевна Шакир

27.02.2024

