

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Насибова Элвина Мубариз оглы
«Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических
протеаз с использованием микромицетов», представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность исследования. Диссертационная работа Э.М. Насибова посвящена разработке биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз, образуемых мицелиальными грибами.

Коллагенолитические ферменты, или коллагеназы, присутствуют в тканях животных, клетках микроорганизмов и корнях некоторых растений. По сравнению с растениями и животными микроорганизмы в качестве продуцентов коллагеназ имеют множество преимуществ, среди которых можно выделить их способность расти на простых по составу и дешевых средах, высокую продуктивность, возможность экзогенной регуляции процессов биосинтеза коллагеназ, отсутствие прионов, относительная простота процессов выделения и очистки коллагеназ, возможность генно-инженерных манипуляций.

Хорошо известно, что первый коммерческий препарат коллагеназ микробного происхождения был получен из культуры *Clostridium histolyticum*. Коллагеназы этой бактерии производятся до сих пор и их можно найти на рынке. Однако эта бактерия обладает рядом недостатков, среди которых в первую очередь можно назвать патогенность, токсигенность и анаэробность, накладывающие определенные физиологические и технологические ограничения на получение продуцируемой ей коллагеназы. Поэтому особый интерес в качестве продуцентов коллагенолитических протеаз вызывают микромицеты, так как их использование позволяет варьировать различные типы культивирования, получая различные количества ферментов или даже ферменты с разными свойствами. Несмотря на существование многочисленных исследований, посвященных изучению протеолитической активности различных микроорганизмов, в настоящее время поиск новых эффективных продуцентов коллагеназ остается актуальной биотехнологической задачей, особенно в виду перспектив их использования в медицине. В последнее время разрабатываются терапевтические методы, основанных на малоинвазивных подходах, в том числе с использованием ферментов, к числу которых относятся коллагеназы. Миграция клеток и ремоделирование коллагена во время восстановления и регенерации тканей является важным этапом в процессе заживления ран, где коллагеназа играет ключевую роль. Для улучшения процесса заживления используются мази с коллагеназой, которые осуществляют ферментативную очистку и потенциально облегчают процесс эпителизации во время санации. Другие применения фермента включают лечение грыжи межпозвоночного диска, фиброза и цирроза печени, контрактуры Дюпюитрена и болезни Пейрони,

миомы матки. Получение с помощью коллагеназ отдельных клеток из тканей печени и поджелудочной железы позволяет использовать их для лечения хронического панкреатита и диабета. Указанные способы применения коллагенолитических ферментов лишь подчеркивают, что современная биоиндустрия нуждается в новых препаратах коллагеназ.

Целью работы была разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов из коллекции микроорганизмов ФГБНУ ВИЛАР.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов диссертации. Все представленные в настоящей работе результаты получены впервые. Автором предложен комплекс критериев, позволяющих проводить отбор перспективных продуцентов коллагенолитических ферментов. Был выявлен и охарактеризован коллекционный штамм *Aspergillus fumigatus* F 22 в качестве продуцента коллагенолитических ферментов. Оптимизирован состав питательной среды для культивирования и условия ферментации микромицета. Автором работы была разработана оригинальная двухстадийная схема выделения протеазы, позволяющая провести очистку коллагенолитических ферментов в 25 раз и получить электрофоретически гомогенный препарат. Охарактеризованы некоторые физико-химические и биологические свойства коллагенолитической протеазы *A. fumigatus*. Впервые проведен сравнительный анализ коллагенолитической активности 47 коллекционных штаммов микромицетов до и после их хранения на агаризованных средах. Разработаны условия криоконсервации и лиофилизации, позволяющие сохранять жизнеспособность, высокую продуктивность и коллагенолитическую активность продуцента.

Изученные Э.М. Насибовым биотехнологические процессы позволили определить критерии для создания универсальной технологии и эффективного получения коллагенолитических ферментов с использованием микромицетов. Разработанный им комплекс показателей дал возможность провести скрининг коллекционных культур из биокolleкции ВИЛАР и отобрать перспективный продуцент коллагеназ. Так, было показано, что пассирование на культуральной среде с индуктором может являться перспективным подходом для увеличения коллагенолитической активности микромицетов. На основе изучения влияния качественного и количественного состава питательных сред и посевного материала оптимизированы условия культивирования продуцента.

Разработанные автором методы выделения и очистки фермента до гомогенного состояния обеспечивают возможность проведения доклинических исследований с целью определения эффективности и биобезопасности препарата для использования в медицине.

Таким образом, можно заключить, что полученные результаты имеют существенную научную новизну, высокую теоретическую значимость и вносят новый вклад в получение препаратов коллагеназ микромицетов.

Степень достоверности и обоснованности научных результатов, положений и выводов. Верификация полученных результатов работы подтверждается большим разнообразием использованных методов, включающих статистическую обработку значительного объема полученных экспериментальных данных, анализом и обобщением широкого спектра литературных данных в исследуемой области, а также воспроизводимостью результатов исследования. Положения и выводы, выдвинутые в диссертационной работе, являются обоснованными и соответствуют полученным результатам.

Объем, содержание и оформление диссертации. Диссертация Э.М. Насибова построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 172 страницах, содержит 26 таблиц и 46 рисунков. Библиографический указатель содержит 332 источника литературы.

Раздел «Введение» содержит подробную информацию об актуальности предмета исследований, степени разработанности выбранной темы, о научной новизне, теоретической и научно-практической значимости работы. Четко сформулированы цель и задачи работы. Показан личный вклад автора в процесс получения результатов, в их представление на российских и международных конференциях и выставках, а также в подготовке публикаций по теме диссертационной работы.

В разделе «Обзор литературы» имеется содержательная информация о коллагенолитических ферментах и их применении, необходимая для понимания объекта исследований.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит развернутую информацию об использованных в ходе работ современных методах и подходах и включает большой пул микробиологических и биохимических методов.

В разделе «Результаты и их обсуждение» представлен весь спектр полученных результатов и их обсуждение, основанное на систематизации и сравнительном анализе полученных и литературных данных. Результаты собраны в отдельные разделы, согласно поставленным задачам, что удобно для чтения и понимания. Представленный экспериментальный материал логично изложен и дает полную картину о полученных Э.М. Насибовым результатах.

Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе, вопросы. Необходимо отметить, что исследование хорошо продумано, логично выстроено, аккуратно и грамотно выполнено. Цель работы четко сформулирована. Задачи соответствуют цели исследования. Следует подчеркнуть грамотный анализ состояния проблемы, интересное изложение полученного материала, использование автором ряда современных методов. Рисунки и таблицы выполнены качественно и наглядно иллюстрируют полученные автором результаты. Автором получен огромный

объем экспериментальных данных, который был обработан с применением статистического анализа. Выводы по работе представляются достаточно полными и убедительными.

По ходу прочтения текста диссертации были отмечены опечатки, грамматические и пунктуационные ошибки, не влияющие на значимость работы и понимание смысла прочитанного.

При знакомстве с методами и результатами исследований возникли следующие замечания и вопросы:

- 1) почему вместо общепринятого термина «глубинное культивирование» автор использует термин «погруженное»?
- 2) ссылки на источники цитированной литературы приведены в тексте не по порядку, это затрудняет обращение к списку литературы.
- 3) 5-ое положение, выносимое на защиту, довольно очевидно исходя из определения твердофазного культивирования как такового.
- 4) при приведении перечня микроорганизмов из разных родов в тексте лучше делать это по алфавиту.
- 5) микромицет *Aspergillus ruber* является ксерофилом – насколько подходят используемые в диссертации условия для него?
- 6) на рисунках 8-11 и 13 в одинаковой гамме приведены разные активности грибов, лучше бы сделать это одинаково; кроме того, подписи в легенде к этим же рисункам неудачны, так как приведенные аббревиатуры штаммов не расшифрованы и их расшифровку нужно искать в тексте дополнительно.
- 7) выбранный продуцент коллагеназ *Aspergillus fumigatus* является патогеном. Насколько целесообразно его применение в биотехнологии?
- 8) некоторые иллюстративные позиции (например, рисунки 21 и 22, таблица 16 и рисунок 25) дублируют данные друг друга.
- 9) в обсуждении результатов и заключении есть повторы текстовых фрагментов из предыдущих разделов.

Хочу отметить, что высказанные замечания и вопросы не снижают высокой оценки работы и не снижают высокого научного уровня представленных результатов.

Публикации. В ходе работы над кандидатской диссертацией автором опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в библиографических базах Web of Science, Scopus и РИНЦ (все – в рецензируемых журналах ВАК), 13 тезисов.

Заключение. Диссертационная работа Насибова Элвина Мубариз оглы «Разработка биотехнологических процессов получения коллагенолитических протеаз с использованием микромицетов», обладает высокой научной новизной, существенной теоретической и практической значимостью, отличается достоверностью полученных результатов, а также продуманностью и аргументированностью положений и выводов, направлена на решение актуальных проблем в исследуемой области, что делает работу

законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей требованиям Постановления правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 26.10.2023 г.) «О порядке присуждения ученых степеней», и паспорту специальности 1.5.6. «Биотехнология», а ее автор, Насибов Элвин Мубариз оглы, без сомнения заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук.

Официальный оппонент:

Осмоловский Александр Андреевич

Кандидат биологических наук

(специальности 03.02.03 – Микробиология, 03.06.01 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии))

Доцент кафедры микробиологии

Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

199991, г. Москва, Ленинские горы, д.1., стр. 12

Телефон оппонента: 89168168739

E-mail: aosmol@mail.ru

 /А.А. Осмоловский/

Подпись А.А. Осмоловского заверяю

ученый секретарь биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.

Ломоносова»

 /Петрова Е.В./

Заместитель декана биологического факультета

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.

Ломоносова»

Д.б.н., профессор

 /Рубцов А.М./

