

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази на тему «Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 - «микробиология»

Актуальность темы исследования

Патогенные грибы представляют серьезную угрозу для сельского хозяйства, вызывая масштабные эпидемии сельскохозяйственных культур, которые ежегодно приводят к глобальным потерям урожая. Микозы животных оказались причиной вымирания многих видов, например, земноводных. Сотни видов грибов способны инфицировать человека, вызывая опасные для жизни заболевания. Рост заболеваемости грибковыми инфекциями усугубляется развитием устойчивости патогенов к существующим антифунгальным препаратам, что резко снижает эффективность терапии. В настоящее время арсенал одобренных противогрибковых средств крайне ограничен, а резистентность к ним приводит к увеличению смертности и осложнений. В связи с этим поиск новых противогрибковых препаратов и эффективных методов их изучения является приоритетной задачей современной биомедицины.

В данной диссертации применен метод SCRAPPY (Single Cell Rapid Assay of Proteome Perturbation in Yeast) для анализа влияния антимикотиков на количество белков в отдельных клетках дрожжей. Этот подход позволяет исследовать действие химических соединений на содержание флуоресцентно меченых белков в клетках. С помощью SCRAPPY можно сравнительно быстро получать информацию о клеточном ответе на воздействие химических веществ и предполагать возможные механизмы их действия.

Достоверность и научная новизна результатов диссертации

Достоверность полученных результатов, выводов и положений не вызывает сомнений и подтверждается достаточным количеством исследуемого материала, использованием современных методов исследования. Все полученные автором результаты статистически обработаны с помощью современных компьютерных программ, выбор метода обработки соответствовал объему и формату проведенных исследований.

Основная новизна исследования заключается в разработке метода SCRAPPY — быстрого и экономичного подхода для анализа протеомных изменений в *S. cerevisiae* на уровне единичных клеток с использованием проточной цитометрии. Метод позволяет за 5–6 часов получать количественные данные о клеточном ответе на антимикотики, выявляя гетерогенность реакций, незаметную при популяционном анализе (например, неоднородное изменение митохондриальных белков под действием тиазолидинов). SCRAPPY также исключает искажения от мертвых клеток, фокусируясь на живых, что актуально для терапевтических концентраций.

Применение метода раскрыло новые механизмы действия антимикотиков: роль переносчика Hxt3 в чувствительности к микозидину, индукцию Hom2, Aro3 и Trx2 алкилированными цитидинами (SOV4/SOV8), а также доминирование азольного компонента в гибридном соединении L173. Впервые показана нелинейная фунгицидная активность натамицина, эффективность которого снижается выше МИК.

Степень обоснованности научных положений и выводов сформулированных в диссертации

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы и соответствуют целям и задачам исследования. Для корректного обоснования цели автор провел детальный анализ обширного массива научной литературы (212 источников). Полученные экспериментальные данные подвергнуты всестороннему теоретическому анализу с учетом современных представлений в области исследования.

Основные положения, выносимые на защиту, логически обоснованы и подтверждены представленными в работе результатами, которые наглядно иллюстрированы 17 таблицами и 31 рисунком. Все задачи и выводы связаны между собой, что обеспечивает целостность исследования.

Ценность для науки и практики результатов работы:

Полученные результаты предоставляют ценную информацию о механизмах действия ряда антимикотиков, ранее не имеющих четкого объяснения. В частности, было продемонстрировано специфическое увеличение уровня белков, отвечающих за функционирование клеточных систем, на которые нацелены препараты с неизвестными механизмами действия. Это открытие может стать основой для дальнейших исследований в области молекулярной биологии и фармакологии, а также значительно расширить понимание взаимодействия между противогрибковыми средствами и

клеточными механизмами. Разработанный метод SCRAPPY позволяет быстро и эффективно анализировать механизмы действия различных биологически активных соединений, что делает его полезным инструментом в микробиологии и разработке новых лекарственных препаратов. Понимание молекулярных механизмов действия антимикотиков может помочь исследователям и врачам более точно настраивать подходы к лечению грибковых инфекций и предвидеть механизмы резистентности патогенов к противогрибковым препаратам, что является актуальной задачей в клинической практике.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертационной работы

По результатам диссертационного исследования опубликовано 12 научных трудов, из которых 6 статей размещены в рецензируемых журналах, индексируемых в международных наукометрических базах Scopus и Web of Science. Остальные 6 публикаций представлены в изданиях, включающих сборники материалов научно-практических конференций и форумов.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази изложена на 178 страницах печатного текста. Диссертация построена по традиционному плану - состоит из введения, основной части, включающей 5 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы из 212 источников и приложений.

Во «Введении» обосновывается актуальность проблемы, раскрываются цели и задачи исследования, обозначается научная новизна, теоретическая и практическая значимость, перечисляются материалы и методы исследования, подлежащие защите, подтверждается достоверность исследования и представляется информация о проверке результатов исследования.

В «Обзоре литературы» автор рассматривает возбудителей грибковых заболеваний, включая фитопатогенные грибы и микозы человека, а также современные антифунгальные препараты и механизмы их действия. Анализируются вопросы устойчивости патогенов, пути преодоления резистентности и препараты, используемые в клинической практике. Особое внимание уделено *Saccharomyces cerevisiae* как модельному организму для изучения антимикотиков, его применению в хеномиксе и протеомном анализе. Также рассматривается флуоресцентная проточная цитометрия

как инструмент для исследования белков и гетерогенности клеточного ответа на антимикотики.

В разделе «Материалы и методы исследования» представлен детальный и обоснованный выбор объектов и методик, полностью соответствующих целям и задачам диссертационной работы. Используемые микробиологические, молекулярно-биологические, аналитические и биоинформатические методы являются современными и широко применяемыми в исследовании антимикотиков. Их сочетание обеспечивает всесторонний анализ влияния тестируемых соединений на дрожжевые клетки. Представленные методы позволяют получить достоверные и воспроизводимые результаты, что подтверждает научную обоснованность проведенного исследования.

Результаты исследования изложены в трех главах (3–5). Автор последовательно излагает полученные данные в соответствии с поставленными задачами, сопровождая их обсуждением. Представленные результаты включают 17 таблиц и 31 рисунок.

В главе 3 представлен метод сравнения содержания ряда белков *S. cerevisiae* в ответ на ксенобиотики. Создана панель штаммов с GFP-мечеными белками, участвующими в ключевых клеточных процессах, что позволило отслеживать изменения их уровня с помощью проточной цитометрии. Анализ выявил характерные профили клеточного ответа на различные классы антимикотиков и позволил определить механизмы действия ранее нехарактеризованных соединений. Метод SCRAPPY обеспечил сравнительный анализ азолов, тиазолидинов и нового гибридного препарата L-173, сочетавшего тиазолидин-2,4-дион и триазол.

В главе 4 с использованием проточной цитометрии проведено исследование влияния протестированных антимикотиков на клеточный цикл *S. cerevisiae* путем количественного анализа содержания меченого гистона Htb2-GFP. Установлено, что все соединения останавливали деление клеток, но механизмы их действия различались. Азолы не изменяли распределение гистонов, тогда как N4-алкил-цитидин (SOV4), тиазолидины (микозидин и 3Мус) и соединения ионофоров меди (MP и 11326083) вызывали остановку клеточного цикла на стадии 1С ДНК. Впервые показана такая активность ионофоров меди. В отличие от них, 5-FC, туникамицин и SDS способствовали накоплению клеток в фазе 2С ДНК.

В главе 5 также представлены исследования классических полиеновых антимикотиков и их водорастворимых производных, проведенные на мутантах *S. cerevisiae* с

делециями ключевых генов биосинтеза эргостерола (*ERG6*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG5* и *ERG4*). Анализ чувствительности показал, что отсутствие *ERG6* значительно повышало устойчивость к производным полиенов, а делеция *ERG4* увеличивала чувствительность к амфотерицину и производному нистатина LCTA 3255. Кроме того, исследование фунгицидного действия натамицина и его производного LCTA 3115 выявило их активность при концентрациях, близких к МИК, но этот эффект исчезал при остановке клеточного цикла, что ранее не было описано для полиенов.

В Заключение автор приводит анализ и обсуждение полученных данных и результатов. **Выводы**, представленные по итогам диссертационного исследования, соответствуют основным положениям и полностью отвечают поставленным задачам.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации. Диссертация и автореферат Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази соответствует всем правилам написания и оформления соответствующих научных работ, установленным в нормативных документах.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

Автором достигнута заявленная цель исследования – разработка высокоэффективного метода получения характеристик ответа клеток грибов на воздействие веществ с антифунгальной активностью и применение этого метода для характеристики и сравнения механизмов действия известных и новых видов антимикотиков на клетки дрожжей. Диссертация написана корректным научным языком, текст логично и грамотно изложен, снабжен необходимыми табличными данными и рисунками. Существенных недостатков в содержании и оформлении диссертации не выявлены. К недостаткам работы можно отнести следующее:

С точки зрения удобства восприятия данных было бы полезно на каждой, а не только первой, тепловой карте изменений содержания маркерных белков помечать к каким клеточным системам они относятся.

В главе IV, в которой показываете, что белок Htb2-GFP может быть использован для быстрой детекции влияния антимикотиков на клеточный цикл дрожжей, хорошо было бы привести сравнение результатов оценки изменений клеточного цикла по изменению пиков Htb2-GFP и классической методики – окраски пропидий йодидом.

Основной массив данных получен с использованием одного метода SCRAPPY. Работа была бы лучше, если бы автор активнее использовал и другие методы, поскольку SCRAPPY в одиночку не позволяет ответить на все интересующие вопросы о механизме действия изучаемых противогрибковых веществ.

Вопросы для дискуссии :

- 1- Разработка новой методики подразумевает, в том числе, и сравнение ее результатов с результатами, полученными с помощью других методик. Было ли проведено сравнение ответа *S. cerevisiae* на известные антимикотики полученного с помощью метода SCRAPPY с данными транскриптомики или протеомики?
- 2- В подписи к рисунку 15 написано: “Алкилированные аналоги цитидина вызывают увеличение уровня ряда белков, участвующих в биосинтезе аминокислот, и белков, ассоциированных с окислительным стрессом”. При этом, тепловая карта показывает увеличение еще и белков, отмеченных как участвующих в углеводном обмене, белков теплового шока и фолдинга белков. Подобный, множественный, эффект наблюдался на тепловых картах большинства воздействий. По каким критериям вы определяли, в каких группах белков изменения считать существенными?
- 3- Многие из белков использованных в SCRAPPY вели себя примерно одинаково в ответ на все исследованные стрессы. Можно ли сократить панель изучаемых белков для снижения трудозатрат на получение данных?
- 4- Считаете ли вы панель белков использованных в SCRAPPY достаточно полной или на основании опыта использования дополнили бы ее другими маркерными белками?

Заключение:

Диссертационное исследование Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази «Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами», представленное к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой предложено новое решение задачи поиска и изучения противогрибковых препаратов с использованием метода SCRAPPY. Этот

метод позволяет исследовать влияние антимикотиков на продукцию белков в *Saccharomyces cerevisiae*, открывая возможности для разработки новых препаратов и борьбы с грибковыми инфекциями, имеющей существенное значение для микробиологии (биологические науки). Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, согласно п. 2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного ученым советом РУДН протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор, Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11 Микробиология.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России № 622 от 1 июля 2015 г.), необходимых для работы диссертационного совета ПДС 0300.010

Официальный оппонент

старший научный сотрудник Лаборатории фотохимии биомембран Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

e-mail: sviatoslav.sokolov@gmail.com

кандидат биологических наук,

03.01.03 - Молекулярная биология

6 февраля 2025 г.



Соколов Святослав Сергеевич

Подпись к.б.н. Соколова С.С. заверяю
Ученый секретарь НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ,
кандидат биологических наук
Севостьянова Ирина Александровна
«06» февраля 2025 г.



Отзыв официального оппонента Соколова С.С. на диссертацию Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази по теме: "Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами"