

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, Московская область, г. Серпухов, г. Пушкино,
проспект Науки, д.3.

Тел./факс: (4967)73-26-36, e-mail: info@pncbi.ru,

<https://www.pbcras.ru>

ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983,

ИНН/КПП 5039002841/503901001

06.02.2025 № 191-01-2115/122
На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
ФИЦ ПНЦБИ РАН

канд.биол. наук

Е.Е. Фесенко
« 06 » февраля 2025 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» о научно-практической ценности диссертации Оренф Эслам Шаабан Мохамед Гхази «Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Грибковые инфекции представляют собой серьезную угрозу для здоровья человека, сельского хозяйства и экосистем в целом. Фитопатогенные грибы ежегодно наносят значительный ущерб урожаю сельскохозяйственных культур, а патогенные грибы, поражающие позвоночных, в том числе человека, приводят к высоким показателям смертности. В связи с ограниченным числом доступных классов антимикотических препаратов и растущей устойчивостью патогенов к существующим лекарственным средствам, вопрос разработки новых противогрибковых соединений и изучения их влияния на клетки грибов приобретает первостепенное значение.

В представленной диссертации предложен новый метод анализа реакции дрожжевых клеток на антимикотические вещества, что позволяет детально изучить влияние тестируемых соединений на белки клеток дрожжей. Важно отметить, что разработанный подход способствует сравнительному анализу известных и новых соединений, идентификации ключевых особенностей их воздействия, а также исследованию их влияния на клеточный цикл грибов.

Таким образом, актуальность данной работы обусловлена не только необходимостью поиска эффективных противогрибковых средств, но и потребностью в новых методологических подходах к изучению их воздействия на белковый состав грибковых клеток. Представленные в диссертации исследования имеют значительный потенциал для развития фундаментальной микробиологии.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази на тему «Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами» представляет собой значительное научное исследование, вносящее вклад в развитие микробиологии и медицинской микологии.

Научная новизна работы заключается в разработке и внедрении нового метода SCRAPPY (Single Cell Rapid Assay of Proteome Perturbation in Yeast), позволяющего проводить экспресс-анализ изменений протеома на уровне отдельных клеток *Saccharomyces cerevisiae* под воздействием антимикотиков. В отличие от традиционных методов, таких как анализ роста клеток на агаризованных средах или масс-спектрометрия, данный метод дает возможность исследовать клеточный ответ с высокой точностью и воспроизводимостью, обеспечивая количественное измерение экспрессии GFP-меченных белков за короткий промежуток времени (5-6 часов) и с минимальными ресурсными затратами.

Применение метода SCRAPPY позволило впервые выявить ранее неизвестные особенности механизма действия ряда антимикотиков. В частности, продемонстрировано, что тиазолидиновый антимикотик микозидин индуцирует экспрессию транспортера глюкозы Hxt3, а его отсутствие значительно повышает чувствительность клеток к данному веществу. Также впервые охарактеризованы механизмы действия алкилированных нуклеозидов SOV4 и SOV8, приводящих к увеличению уровня белков, участвующих в синтезе ароматических аминокислот и в окислительном стрессе. Кроме того, установлено, что гибридное соединение L173, содержащее азольную и тиазолидиновую части, демонстрирует клеточный ответ, аналогичный азольным антимикотикам, что указывает на отсутствие значительного вклада тиазолидиновой части в его активность.

Важным результатом работы является также обнаружение гетерогенного ответа клеток на воздействие тиазолидиновых антимикотиков, что ранее не было описано. Это

явление выражается в изменении уровня митохондриальных белков только в части клеточной популяции, что свидетельствует о сложности адаптационных механизмов в ответ на антимикотики.

Дополнительно в работе впервые продемонстрировано необычное фунгицидное действие натамицина: его максимальная эффективность наблюдается при концентрациях, близких к минимальной ингибирующей концентрации (МИК), тогда как при более высоких концентрациях его способность вызывать гибель клеток значительно снижается.

Теоретическая и практическая значимость диссертации

Полученные результаты обладают как фундаментальной, так и прикладной ценностью, способствуя углубленному пониманию механизмов действия антимикотиков и открывая перспективы для разработки новых противогрибковых стратегий. С теоретической точки зрения, исследование выявило новые аспекты клеточного ответа на антимикотики, включая специфическое увеличение уровня белков, связанных с механизмами действия известных веществ, а также ранее неизвестные эффекты для ряда новых соединений. Сходство в изменении количества белка, меченного GFP, наблюдается среди аналогов нуклеозидов (SOV-4, SOV-8), азолов (вориконазол, флуконазол), тиазолидинов (микозидин, 3В-Мус) и транспортеров молекул двухвалентных металлов. Впервые подробно изучен молекулярный механизм действия тиазолидинового антимикотика микозидина, продемонстрирована его связь с транспортером глюкозы Hxt3, а также охарактеризованы эффекты алкилированных нуклеозидов SOV4 и SOV8, индуцирующих белки, участвующие в синтезе аминокислот и окислительном стрессе.

Практическая значимость работы заключается в разработке и апробации нового метода SCRAPPY, позволяющего оперативно и с высокой точностью оценивать изменения протеома дрожжевых клеток в ответ на антимикотики. Данный метод открывает возможности для масштабного тестирования новых потенциальных противогрибковых соединений, быстрого анализа их механизмов действия и выявления клеточных ответов на уровне отдельных клеток, что особенно важно в свете растущей проблемы резистентности грибов к существующим антимикотикам. Кроме того, SCRAPPY может быть использован не только для исследования противогрибковых препаратов, но и для оценки токсичности различных химических соединений, изучения адаптационных реакций клеток к стрессовым воздействиям и разработки персонализированных подходов к терапии инфекционных заболеваний. Возможность выявления клеточной гетерогенности и динамики ответа отдельных клеток расширяет

перспективы метода в фармакологическом скрининге, фундаментальной микробиологии и биотехнологии.

Разработанный подход к изучению клеточного цикла с использованием гистонового белка Htb2-GFP представляет собой удобный и воспроизводимый метод для выявления нарушений клеточного деления под воздействием различных соединений. Это делает его полезным инструментом не только в микробиологических исследованиях, но и в биотехнологии, а также при разработке и тестировании новых лекарственных препаратов.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом

Диссертация Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази носит завершенный характер и оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 212 источников. Работа изложена на 178 страницах, содержит 17 таблиц и 31 рисунок.

Во введении автор обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности темы, цель работы, задачи исследования, научная новизна и практическая ценность работы, теоретическая и практическая значимость, степень достоверности, апробация результатов, личный вклад автора и сформулированы положения, выносимые на защиту.

Первая глава освещает обзор литературы, включающий сведения о различных видах грибковых инфекций, наиболее распространенных классах противогрибковых препаратов, их действии и механизме резистентности, важности использования *S.cerevisiae* в качестве модельного организма для идентификации мишеней противогрибковых препаратов и описание протеомных методов, включая проточную цитометрию и включение зеленого флуоресцентного белка в изучение противогрибковой активности биологически активных веществ. На мой взгляд, автор умело синтезирует широкий спектр литературы, распределяя ее по соответствующим темам и подтемам. В обзоре критически оценивается каждый источник, выделяются сильные стороны, ограничения и пробелы в существующих знаниях. Этот всесторонний анализ закладывает прочный фундамент для постановки задач исследования и определяет его значимость.

Вторая глава описывает материалы и методы исследования, включающие актуальные микробиологические, молекулярно-генетические и бионформатические подходы. Особое внимание уделено фенотипическим методам определения устойчивости

к антифунгальным препаратам, что подчеркивает стандартизированный и клинически релевантный характер исследования. Значительным преимуществом является использование проточно-цитометрического анализа для количественной оценки изменений уровня GFP-меченых белков, а также флуоресцентной микроскопии для визуальной валидации данных, что повышает достоверность результатов.

Статистический анализ выполнен с применением корреляционных коэффициентов Пирсона и Спирмена, парного t-теста ($p < 0,05$), теста Фридмана с поправкой Данна-Бонферрони и анализа главных компонент (PCA). Анализы проводились в R, Microsoft Excel и с использованием онлайн-инструментов (Statistics Kingdom, Statistiy). Выбор методов обоснован, обеспечивает корректность интерпретации данных и их воспроизводимость.

Результаты исследования и их обсуждение включают описание и анализ полученных данных, представленных в третьей, четвертой и пятой главах, соответствующих основным направлениям исследования.

Третья глава посвящена разработке методики SCRAPPY. В рамках исследования определялись значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) тестируемых веществ, изучался клеточный ответ дрожжевых штаммов с GFP-мечеными белками, а также анализировалась гетерогенная реакция клеточных популяций на противогрибковые агенты. Представлены данные о механизмах противогрибковой активности микозидина, исследованные с использованием метода SCRAPPY, а также сравнительный анализ действия классических азольных соединений, тиазолидиновых противогрибковых препаратов и гибридного соединения L-173 на данные штаммы.

В четвертой главе автор исследовал влияние различных соединений на клеточный цикл путем количественной оценки уровня меченых гистоновых белков в клетках. Анализ методом проточной цитометрии первоначально проводился на экспоненциально растущих дрожжевых культурах, содержащих 10 различных меченых гистоновых белков (Hhf1, Hhf2, Hho1, Hht1, Hht2, Hta1, Hta2, Htb1, Htb2 и Htz1). Интересно, что только Hta2 и Htb2 демонстрировали отчетливое бимодальное распределение флуоресценции, напоминающее распределение содержания ДНК. Соединения ионофоров меди (MP, 11326083) и тиазолидины (микозидин и его бензоильное производное 3В Мус) и SOV4 вызывали накопление в популяции клеток в фазе 1С, тогда как туникамицин, 5-FC и SDS вызывали накопление в популяции клеток в фазе 2С. Полученные результаты дают ценное представление о влиянии этих соединений на прогрессию клеточного цикла, подчеркивая их потенциал в качестве модуляторов клеточных процессов.

Пятая глава посвящена оценке повышенной водорастворимости вновь синтезированных амидных производных полиенов и изучению их противогрибковой активности в отношении мутантных штаммов *S. cerevisiae* с делециями генов, участвующих в биосинтезе эргостерола. Кроме того, исследуется фунгицидное и фунгистатическое действие натамицина и его недавно синтезированных производных на дрожжевые клетки.

В разделе «Заключение» сделано обобщение результатов работы. Выводы, сформулированные в диссертации, полностью соответствуют поставленным задачам, логично вытекают из результатов работы и являются в полной мере обоснованными. Представленные в диссертационной работе результаты экспериментов свидетельствуют, что поставленные задачи были успешно решены.

В разделе «Приложение», который включает 19 таблиц и 1 рисунок, приведены химические названия и структуры соединений, использованных в исследовании, а также результаты различных статистических тестов, применённых в ходе работы.

Обоснованность и достоверность полученных результатов, научных положений и выводов.

Научные положения и выводы диссертационной работы Оренф Эслам Шаабан Мохамед Гхази являются полностью обоснованными, а полученные результаты не вызывают сомнения.

Результаты исследования подтверждены использованием статистически достоверных методов, таких как проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия и тестирование чувствительности к биологически активным веществам. Для анализа данных использовались программа CytExpert и пользовательские скрипты Python, что обеспечило высокую точность. Статистический анализ включал парный t-тест, тест Фридмана с пост-хок тестом Данна-Бонферрони и коэффициенты корреляции Пирсона и Спирмена, что обеспечило надежность и достоверность полученных результатов.

Работа отличается целостностью, завершенностью, соответствием содержания диссертации автореферату, опубликованным научным работам, а также паспорту научной специальности 1.5.11 Микробиология.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты данного исследования предоставляют новый и эффективный инструмент для хемо-протеомного профилирования на уровне отдельных клеток, который может быть использован для более глубокого понимания клеточных ответов на

биологически активные вещества, включая антифунгальные препараты. Это открывает возможности для исследования механизмов действия новых антимикотиков, что имеет важное значение для борьбы с микозами и проблемой антифунгальной резистентности.

Метод SCRAPPY, разработанный в ходе работы, уже используется в Институте ФИЦ биотехнологии РАН для исследования нового профиля соединений с неизвестным механизмом действия, таких как алкилированные цитидины. Результаты продемонстрировали участие биосинтеза ароматических аминокислот и окислительного стресса, что открывает новые перспективы для разработки более эффективных терапевтических стратегий и понимания молекулярных механизмов воздействия биологически активных веществ. Рекомендуется дальнейшее применение метода для анализа других биологически активных соединений и расширение его использования в биотехнологической и фармацевтической практике.

Личное участие автора в получении результатов

Диссертационная работа представляет собой завершённый и самостоятельно выполненный труд автора, который принимал непосредственное участие во всех этапах исследования. Автор также занимался анализом полученных результатов и подготовкой их для публикации научных статей. В ходе работы был проведён обширный анализ отечественных и зарубежных источников литературы что обеспечило глубокое теоретическое основание для экспериментов. Кроме того, автор активно участвовал в подготовке докладов и оформлении текста диссертации, что подтверждает его важный вклад в работу.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Высокий уровень научной значимости диссертационной работы подтверждается публикацией 6 статей в журналах Q1, индексируемых в международных базах цитирования Scopus и Web of Science (WoS). Это свидетельствует о признании полученных результатов мировым научным сообществом, их актуальности и новизне. Публикации в ведущих рейтинговых журналах указывают на высокое качество проведенных исследований, строгость методологии и значительный вклад в развитие научной области. Такой уровень публикационной активности подчеркивает весомость диссертации и ее потенциальное влияние на дальнейшие исследования в данной сфере.

Замечания по диссертационной работе:

- 1- Есть несоответствие в текстовой разбивке работы (Глава I, II и т.д.) с цифровой индикацией. Например, Обзор литературы помещён в Главу I, тогда как внутренняя разбивка начинается с 2.1. И далее это несоответствие сохраняется.
- 2- В тексте встречаются опечатки и стилистические ошибки.
- 3- В Таблице 3 не все гены описаны исчерпывающе.
- 4- На Рис.7 не указана размерность осей.

Вопросы по диссертационной работе:

- 1- При исследовании воздействия антифунгальных соединений на экспрессию митохондриальных белков анализировались два белка – Ald4 и Idp1 Рис.24. При этом изменение экспрессии Ald4 регистрировалась при обработке клеток 4 соединениями (5FC, 11326083, микозидином и 3В-Мус), а Idp1 только двумя соединениями (микозидином и 3В-Мус). С чем это связано?

Заключение

Диссертационное исследование Ореиф Эслам Шаабан Мохамед Гхази «Изучение механизмов токсичности и клеточной гибели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванных новыми и классическими противогрибковыми препаратами» является законченной научно-квалификационной работой по специальности 1.5.11 Микробиология, в которой содержится новое решение научной задачи по изучению клеточного ответа дрожжевых клеток на антимикотические препараты, что имеет важное значение для фундаментальной науки и практической микробиологии. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических 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.

Отзыв подготовлен кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником Лаборатории регуляции биохимических процессов Института биохимии и

физиологии микроорганизмов Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН, Валиахметовым Айратом Явдатовичем.

Отзыв обсуждён и одобрен на семинаре Лаборатории регуляции биохимических процессов ИБФМ РАН 5 февраля 2025 г., протокол № 2.

Согласен на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями. Приказа Минобрнауки России № 662 от 1 июля 2015 г.), необходимых для работы диссертационного совета ПДС 0300.010.

Старший научный сотрудник лаборатории регуляции биохимических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Российская Федерация; 142290, Московская область, г. Серпухов, г. Пущино, проспект Науки, дом 5

тел. моб.: +7 926 320 86 34

e-mail: airatv@ibpm.ru

кандидат биологических наук, (1.5.4 Биохимия)

Валиахметов Айрат Явдатович,



Подпись кандидата биологических наук

Валиахметова Айрата Явдатовича Заверяю:

Ученый секретарь ФИЦ ПНЦБИ РАН



Назарова Г.П.