

ОТЗЫВ официального оппонента

о диссертации на соискание учёной степени кандидата химических наук

Чудина Андрея Алексеевича

на тему: «Регуляция каталитических свойств галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* в системах обращённых мицелл»

по специальности 1.5.6. Биотехнология

Актуальность

Болезнь Шагаса – заболевание, вызываемое простейшим организмом-паразитом *Trypanosoma cruzi*. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 6–7 млн человек во всем мире инфицированы *T. cruzi* и ещё 75 млн человек находятся в зоне риска. В настоящее время заболевание лечится всего двумя препаратами: бензнидазолом и нифуртимоксом, однако у данных лекарств есть ряд серьёзных недостатков, в том числе эффективность только на острой или ранней фазе инфекции, побочные эффекты в течение курса приёма и развивающаяся устойчивость паразита к используемым препаратам. Одним из направлений поиска лекарств против болезни Шагаса являются исследования, посвящённые ингибированию биосинтеза соединений, жизненно необходимых *T. cruzi*. Перспективным подходом является ингибирование биосинтеза такого важного соединения как витамин С, антиоксиданта, который трипаносома не может усваивать извне и должна синтезировать самостоятельно. Получаемый таким образом витамин С (и его аналоги) играет важную роль для жизнеспособности *T. cruzi*, защищая её от воздействия активных форм кислорода в ходе проникновения в макрофаги хозяина.

Диссертация Чудина Андрея Алексеевича посвящена изучению свойств галактонолактонооксидазы (TcGAL) (EC 1.3.3.12) – мембранного фермента, катализирующего финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона и, соответственно, выступающего в качестве перспективной лекарственной мишени.

Обнаружены новые классы ингибиторов TcGAL – аллилполиалкоксибензолы (АПАБ) и соединения ряда аллилбензолов и установлены структурные фрагменты, аллильная и метокси- группы, обуславливающие ингибирование фермента. Показано, что ингибирующий эффект АПАБ может быть усилен за счёт присоединения к ним трифенилфосфониевого фрагмента, который, согласно, литературным данным используется для селективной доставки лекарственных молекул в митохондрии. Большой ингибирующий эффект конъюгатов АПАБ по сравнению с немодифицированными АПАБ, согласно данным ИК-спектроскопии, обусловлен большим концентрированием конъюгатов на границе раздела фаз, где, предположительно, локализован целевой TcGAL.

Содержание и завершённость работы

Диссертационная работа Чудина А.А. построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов», «Результатов и обсуждения», «Заключения», «Основных результатов и выводов» и «Списка литературы». Диссертационная работа Чудина А.А. изложена на 131 странице, содержит 58 рисунков и 28 таблиц, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, основной части, содержащей результаты исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 159 ссылок.

Введение отражает цель и задачи диссертационной работы, новизну и практическую значимость, оценку степени достоверности и описание апробации работы, содержит положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях, выполненных по результатам работы. Обзор литературы состоит из трёх разделов, содержание которых отражает состояние науки в области диссертационной работы. В первом разделе приводятся общие сведения о флавин-зависимых дегидрогеназах и оксидазах, к которым принадлежат изучаемые TcGAL и модельный гомологичный фермент L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH). Во втором разделе описываются основы мицеллярного подхода к измерению активности ферментов. Третий раздел посвящён непосредственно литературным данным о TcGAL и AtGALDH. **Экспериментальная часть** работы представлена в главах «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение». Работа завершается Заключением, Основными результатами и выводами и Списком литературы. **Заключение** отражает основные результаты данной работы. Раздел **Основные результаты и выводы** сформулированы чётко, грамотно и обосновано согласно полученным экспериментальным данным. **Список литературы** охватывает широкий временной период и в то же время отражает самые последние результаты по теме диссертационной работы.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в работе, обусловлена большим объёмом исследований и обширной методической базой. Полученные результаты являются достаточными для формулирования представленных выводов. Научная новизна диссертационного исследования и полученных выводов подтверждается 8 публикациями в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", а также 12 тезисами докладов конференций.

Работа отличается логичным и последовательным изложением. Вначале подробно излагаются основные критерии по выбору подходящих электроноакцепторов для разработки методики определения активности TcGAL и AtGALDH и приводятся каталитические параметры систем с использованием данных электроноакцепторов. Далее с использованием разработанной методики автор исследует функционирование ферментов в зависимости от природы мицеллообразующего ПАВ и наличия природных компонент мембран, фосфолипидов. Полученные результаты говорят о возможности регулирования олигомерного состава ферментов за счёт варьирования структуры и заряда ПАВ. Кроме того, показана возможность усиления активности TcGAL и AtGALDH при высоких степенях гидратации в присутствии фосфолипидов, что объясняется образованием белок-липидных комплексов согласно данным ИК-спектроскопии и метода поляризации флуоресценции. На следующем этапе автор проводит подробный анализ потенциальных ингибиторов TcGAL и демонстрирует высокую ингибирующую способность АПАБ и соединений ряда аллилбензола, идентифицирует структурные фрагменты, ответственные за ингибирование, а также устанавливает неконкурентный механизм действия апиола в отношении TcGAL. В заключительной части описаны эксперименты по изучению действия природных соединений, коэнзимов Q, производных 1,4-бензохинона и флавоноидов в отношении TcGAL и AtGALDH и впервые приводятся данные об активаторах TcGAL – кверцетине и дигидрокверцетине. Данные, полученные не только об ингибиторах, но и активаторах, позволяют вести целенаправленный поиск именно тех соединений, которые подавляют активность TcGAL и могут рассматриваться как потенциальная основа для лекарств против болезни Шагаса.

Вопросы и замечания

1. Список сокращений содержит не все аббревиатуры, применяемые в тексте работы (например, FAD, FMN)
2. Стр. 49 Абзац «получение комплексов» следует отнести к разделу материалы
3. Стр.51 содержит повторение информации, изложенной в обзоре литературы.
4. На рис.24 было бы уместнее для восприятия добавить данные по скорости суммарной реакции за вычетом фоновой реакции...
5. Стр. 54 термин «мицеллярный раствор» неудачен, также подобные дисперсные системы не являются оптически прозрачными.
6. Стр. 62 рис.29. Представленные седиментограммы довольно трудно анализировать. Для лёгких частиц ступень ярко выражена, в то время как для тяжёлых частиц чётко выделить сигнал на графике не представляется возможным
- 7.Стр.63 На каком основании делается предположение, что радиус мицелл r_m равен радиусу белка r_b в уравнении 2.
8. Стр.65 сравнивать гидродинамические радиусы разных по химической природе и заряду частиц не очень корректно, метод статического светорассеяния или электронная микроскопия дали бы более адекватный для сравнения результат
9. Стр. 70 Рассуждения о различиях в структуре мицелл основаны на литературных данных о склонности различных ПАВ образовывать различные мицеллы, но в работе не приводятся экспериментальных подтверждений различиям в строении изучаемых мицелл. Также в ходе прочтения работы возникает вопрос, насколько правомочно для практического применения сравнивать результаты, полученные для обратных мицелл, с предполагаемым эффектом взаимодействия с биологической мембраной.
10. Литературные ссылки оформлены в разном стиле.

Перечисленные замечания, однако, не снижают общего положительного впечатления от представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Чудина Андрея Алексеевича является завершённой научно-квалификационной работой, в рамках которой были впервые найдены эффективные ингибиторы TcGAL, представляющие собой потенциальную основу для разработки лекарств против болезни Шагаса. Кроме того, в работе изучены новые электроноакцепторы и активаторы TcGAL, что существенно расширяет представления о возможностях регуляции активности данного фермента. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология, а также критериям, определённым пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Автор работы А.А. Чудин, несомненно, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

кандидат химических наук, доцент Химического факультета

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения

высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Сыбачин Андрей Владимирович



19 ноября 2024 г.

Контактные данные:

Телефон: +7 495 939 31 14, E-mail: sybachinav@my.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

Адрес места работы: 119991, Москва, Ленинские горы, 1-40

Подпись Сыбачина А.В. заверяю:

