

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

Диссертация Чудина А.А. посвящена важной и актуальной теме изучения мембранных ферментов, рассматриваемых, в том числе, как потенциальные лекарственные мишени. В качестве такой мишени автор рассматривает галактонолактонооксидазу (TcGAL) (ЕС 1.3.3.12) – мембранный фермент, катализирующий финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона в одноклеточном паразите *T. cruzi*, вызывающего болезнь Шагаса.

Несмотря на то, что это заболевание не относится к социально-значимым, внимание к причинам возникновения и развития и методам лечения должно быть проявлено должным образом для того, чтобы «чаша весов» не качнулась в сторону нарастания числа заболевших.

Регуляция активности ферментов происходит на клеточном (природном) уровне (генетическая регуляция, пост-трансляционные модификации, ограниченный протеолиз, белок-белковые взаимодействия, аллостерическая регуляция, компартментализация, молекулярный краудинг, гормон-зависимая регуляция). Для целенаправленной регуляции активности ферментов разрабатываются, также, различные подходы на основе физико-химических методов (химическая модификация с внесением новых функций, использование фото- и электрохимическая активации, оптимизация температурного режима). Изменение микроокружения биокатализатора является одним из таких подходов.

В рамках диссертационной работы соискатель разработал эффективную методику определения активности TcGAL и гомологичного модельного фермента L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* с использованием системы обращённых мицелл АОТ. Разработанная методика имеет ощутимые преимущества по сравнению с ранее использовавшейся методикой, такие как отсутствие фонового сигнала и возможность изучения ферментов при их рН-оптимуме. Используя разработанную методику, автором впервые обнаружены новые классы ингибиторов TcGAL – аллилполиалкоксибензолы

(АПАБ) и соединения ряда аллилбензола, некоторые из которых, согласно литературным данным, при сопоставимых концентрациях подавляют рост самой *T. cruzi*. Анализ структур изучаемых ингибиторов позволил автору идентифицировать общие структурные фрагменты, аллильную и метокси-группы, обуславливающие ингибирующий эффект в отношении TcGAL, что открывает пути к целенаправленному поиску ингибиторов данного фермента. Помимо ингибиторов, разработанная методика определения активности позволила изучить влияние электроноакцепторов, активаторов и состава мицеллярной матрицы, что имеет большое значение ввиду ограниченности литературных данных относительно TcGAL.

Диссертационная работа А.А. Чудина изложена по традиционному плану 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.

Обзор литературы можно разделить на две части. Первая часть посвящена описанию двух классов флавин-зависимых ферментов, оксидаз и дегидрогеназ, их структурным особенностям и их практическому применению, в том числе в медицинской области. Вторая часть посвящена мицеллярному подходу к изучению ферментов, который является одним из главных инструментов при работе с водонерастворимыми мембранными ферментами. Обзор написан лаконично, но достаточно полно отражает освещаемую автором тематику.

В разделе «Материалы и методы» описаны экспериментальные подходы и реагенты, использованные в экспериментах данной работы. Следует отметить разнообразие и используемых автором современных методов – это методы биоинформатики, традиционной биохимии, химической энзимологии, а также аналитической химии. Все используемые методические подходы подробно описаны.

В экспериментальной части работы, представляемая главой «Результаты и обсуждение», А.А. Чудин подробно описывает полученные им результаты и на их основании делает обоснованные выводы. Все этапы работы выстроены в логическом порядке и необходимы для подробного описания функционирования TcGAL и AtGALDH. На первом этапе автор исследует ряд потенциальных электроноакцепторов (окислителей), чтобы определить наиболее подходящий из них для разработки эффективной методики определения активности обоих ферментов. На следующем этапе, определив наиболее эффективный электроноакцептор, автор исследует функционирование TcGAL и AtGALDH

в зависимости от состава мицеллярной матрицы и наличия компонентов природной мембраны, фосфолипидов, что позволяет изучать работу этих ферментов в условиях, более близких к природным. На третьем этапе работы автор тщательно изучает потенциальные ингибиторы TcGAL, некоторые из которых, согласно литературным данным, подавляют рост самой *T. cruzi*. Впервые обнаружены эффективные ингибиторы классов аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) и соединения ряда аллилбензола. Автором показано, что халконы, имеющие с АПАБ общие фрагменты, оказались слабыми ингибиторами. Анализируя структуры АПАБ, соединений ряда аллилбензола и халконов, автор идентифицировал фрагменты, ответственные за ингибирование TcGAL. На заключительном этапе автор исследовал влияние природных соединений, коэнзимов Q, производных 1,4-бензохинона и флавоноидов, в отношении TcGAL и AtGALDH. Обнаружены новые электроноакцепторы, коэнзимы Q и соединения ряда 1,4-бензохинона, которые потенциально могут использоваться для разработки новых методик определения активности изучаемых ферментов. Примечательно, что флавоноиды, кверцетин и дигидрокверцетин, являются активаторами TcGAL, что было показано методом УФ-спектрофотометрии. Таким образом, вышеописанные этапы направлены на всестороннее изучение TcGAL и AtGALDH, не ограничиваясь только ингибиторами, что особенно важно ввиду малочисленности данных об TcGAL в литературе.

Работа А.А. Чудина выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современных методов исследования, что обеспечивает достоверность полученных экспериментальных данных. Выводы и заключения, подкреплённые подробным описанием проведённых экспериментов, представляются обоснованными и надёжными. В этом отношении достоинства работы не вызывают сомнений.

Диссертационная работа лишена существенных недостатков, которые могли бы препятствовать её успешной защите. Однако в отношении работы можно сделать несколько замечаний и вопросов:

1. Стр. 5. Молекулярной мишенью туберкулеза является не только (молекулярная мишень – липоамиддегидрогеназа), но и другие ферменты, в частности, цитохромы P450 из *Mycobacterium tuberculosis* м P450 51A1 (CYP51A1), катализирующий реакцию 14 α -деметилования ланостерина с образованием 14-десметилланостерина (4,4-диметилхолеста-8(9),14,24-триен-3 β -ола, а также цитохромы P450 CYP128, CYP121 и CYP125.
2. В обзоре литературы при анализе ингибиторов недостаточно описано, к какому типу ингибиторов относятся отмеченные соединения. Это аналоги субстратов или кофакторов?

Аналоги переходных состояний как интермедиатов катализируемых ферментативных реакций? Насколько специфичны описанные ингибиторы?

3. В разделе 1.2, Мицеллярный подход к изучению ферментов, посвященном функционированию ферментов в обращённых мицеллах, нет обсуждения диффузии субстратов и кофакторов в обращенные мицеллы, содержащие ферменты. Это может быть лимитирующим фактором для проявления каталитической активности фермента. Есть ли зависимость фермент-субстратных взаимодействий от структуры мицелл и их состава?

4. В разделе, посвященном ингибиторам галактонолактонооксидазы и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы Обзора литературы в таблицах 8 и 9 полезно было бы указать дополнительно, что в основном это необратимые ингибиторы, исходя из химической структуры представленных соединений. В обзоре литературы можно порекомендовать дополнительно дать схему каталитического цикла более подробно. Рис. 1 очень схематичен.

5. При анализе механизма действия ингибиторов автор не исследует специфичность действия исследованных соединений группы аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) и соединения ряда аллилбензола. Эти соединения, по своей структуре, не являются аналогами субстратов или аналогами переходного состояния каталитического цикла, поэтому установление специфичности действия таких ингибиторов было бы полезно исследовать и продемонстрировать в работе. Могут эти соединения ингибировать другие трипаносомные инфекции? Например, Африканский трипаносомоз, вызываемый микроорганизмом *Trypanosoma*, может ингибироваться этими соединениями?

6. Вывод, который можно порекомендовать сделать автору: так как флавоноиды (кверцетин и дигидрокверцетин) являются активаторами TcGAL, их прием в качестве биологически активных добавок (БАД) не может быть рекомендован при болезни Шагаса. Кроме того, коэнзим Q10 широко используется как кардиопротектор. Прием такого препарата при болезни Шагаса также не может быть рекомендован.

7. Стр.61 Обсуждения результатов.

«Максимальная активность ферментов в мицеллярных системах наблюдается при степени гидратации W_0 , когда размер внутренней полости мицеллы соответствует геометрическим параметрам солюбилизируемого фермента». Как это соотносится с диффузией субстратов в мицеллы, когда активный фермент-субстратный объем должен увеличиться? Кроме того, теория индуцированного соответствия, когда фермент перестраивается при образовании фермент-субстратного комплекса, также требует некоторой пространственной свободы для

фермента. Насколько полезен такой «структурный краудинг» с позиций каталитической активности?

Небольшие замечания терминологического уровня.

1. Цитохром с (не цитохром С), Стр. 12. холестеролоксидазы (ЕС 1.1.3.6) холестериноксидаза. Стр. 13 перекиси водорода. По современной номенклатуре - пероксид водорода.

2. Стр. 7. при работе в обращенных мицеллах цитохром С денатурирует, но, показано, что операционная стабильность многих гемопротеинов, пероксидазы хрена, каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион-пероксидазы повышается в АОТ (Клячко Н.Л. Левашов А.В., Мол. биология, 1984, т.18 1019-1032, ДАН СССР, 1986,289,1271-1273)

3. Стр. 13. «электроны теряются и не могут быть использованы в последующих метаболических стадиях, как в случае дегидрогеназ». Лучше использовать термин «не соответствие стехиометрии, несопряжение реакции».

4. Стр. 14. Надо использовать единообразное написание кофакторов (ФАД, НАД или соответствующие латинские обозначения.

5. Стр. 21. Что означает термин «комплементарность белков по отношению к ферменту»?

6. Стр. 49. Как рассчитывали концентрацию ферментов? (концентраций ферментов (6 нМ и 34 нМ для AtGALDH и TcGAL, соответственно).

7. Стр. 51. Неудачное выражение (контрольного фермента)

8. Стр. 95. Проводились опыты по ингибированию обеих форм AtGALDH (растительного фермента) только с метилциклодекстрином, без ингибиторов класса аллилбензола?

9. Стр. 123 Обзора литературы, ссылка 71, не указан том, страницы, DOI, ссылка 142, не указаны страницы.

Следует отметить, что вышеуказанные замечания не являются принципиальными и не снижают значимость диссертационной работы, которая, безусловно, заслуживает высокой оценки.

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", а также 12 тезисов докладов на конференциях. Публикации полностью отражают содержание работы.

Подводя итоги, можно с уверенностью сказать, что диссертационная работа Чудина Андрея Алексеевича является завершённым квалификационным исследованием, выводы работы полностью подтверждены результатами различных экспериментов, автореферат и публикации полностью отражают основное содержание диссертации. Диссертация А.А. Чудина соответствует специальности 1.5.6. Биотехнология. Работа полностью отвечает критериям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова в 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:

доктор биологических наук, профессор,

зав. лабораторией биоэлектрохимии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Шумянцева Виктория Васильевна



Контактные данные:

Телефон: +7 (499) 246 58 20, E-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.00.04 – Биохимия

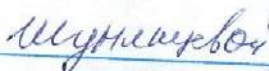
Адрес места работы:

119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

26.11.2024

Подпись Шумянцевой В.В. заверяю:

Подпись



заверяю

Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карлова Е.

