

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертационную работу Чудина Андрея Алексеевича на тему: «Регуляция
каталитических свойств галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* в системах
обращённых мицелл» на соискание учёной степени кандидата химических наук
по специальности 1.5.6. Биотехнология

В настоящее время, согласно данным ВОЗ, примерно 6–7 млн человек в мире инфицированы простейшим паразитом *Trypanosoma cruzi*, вызывающим болезнь Шагаса, а ещё 75-80 млн человек находятся в зоне риска. На фармацевтическом рынке есть два препарата против этой болезни, в частности бензнидазол и нифуртимокс. Однако оба лекарства имеют побочные эффекты. Исследования, направленные на поиск путей ингибирования ферментов, катализирующих биосинтез жизненно необходимых *T. cruzi* соединений, представляются перспективным подходом в данной области. В диссертации Чудина А.А. в качестве такого фермента-мишени подробно изучается галактонолактонооксидаза (TcGAL) (EC 1.3.3.12) – мембранный фермент, катализирующий финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона в *T. cruzi*. Таким образом, **актуальность** данной работы несомненна.

Целью работы является установление механизмов функционирования галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) в мембраноподобных системах и факторов, влияющих на активность данного фермента в сравнении с гомологичным ферментом, функционирующим в водной среде, в частности L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH).

Научная новизна работы. Разработана новая методика определения активности TcGAL и AtGALDH в воде и в мицеллах (АОТ в n-октане), основанная на спектрофотометрическом методе с использованием сочетания феназинметосульфата (электроноакцептор) и 2,6-дихлорфенолиндифенола (проявитель аскорбата - продукта реакции). Данная методика имеет преимущества перед описанными ранее методами на основе 1,4-бензохинона, в частности, высокую чувствительность регистрации сигнала и отсутствие фона. Показано, что небольшие добавки фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина драматически меняли каталитический профиль обоих ферментов, в частности снижается плотность отрицательного заряда на границе раздела фаз за счёт положительного заряда аминогрупп фосфолипидов, а также фосфолипидные добавки влияют на структуру и жесткость мицелл. Впервые найден и исследован ряд эффективных ингибиторов TcGAL и AtGALDH, а именно ликорин и соединения класса терпеноидов (аллилполиалкоксибензолы, АПАБ). Значения IC₅₀ для АПАБ лежат в диапазоне 10-100 мкМ, но эффективность этих соединений возрастает при использовании их комплексов с метил-циклодекстрином, повышающим растворимость соединений. Идентифицированы общие для ликорина и АПАБ структурные фрагменты (метилendioкси-группа и аллильный радикал), которые важны для проявления ингибирующего эффекта. Установлено, что АПАБ оказывают более сильный ингибирующий эффект в отношении оксидазной активности, чем дегидрогеназной. Продемонстрировано, что ликорин действует преимущественно по конкурентному механизму, а апиол является неконкурентным ингибитором TcGAL. Таким образом, **научная новизна** работы очевидна.

Теоретическая значимость работы состоит во всестороннем изучении свойств гомологичных ферментов TcGAL и AtGALDH (влияние ЭА, ингибиторов, компонентов природной мембраны), которое способствует более глубокому пониманию механизмов функционирования мембранных ферментов и открывает новые пути к регуляции их каталитических свойств.

Практическая ценность работы заключается в открытии нового класса ингибиторов фермента TcGAL, которые являются потенциальными лекарствами, поскольку гомологичные дегидрогеназы рассматриваются как терапевтические мишени для лечения целого ряда заболеваний (грибковых, бактериальных, а также вызываемых паразитическими микроорганизмами, например, малярия).

Общая характеристика работы. 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 обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 159 ссылок.

Во Введении автором сформулирована актуальность темы, отражена научная новизна и практическая значимость работы.

В Главе Обзор литературы содержится три подглавы:

1. Принцип действия и природные функции флавин-зависимых оксидаз и дегидрогеназ.
2. Мицеллярный подход к изучению ферментов.
3. Галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi* и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana*.

Таким образом, в обзоре литературы автор сфокусировался на сравнительном анализе флавин-зависимых дегидрогеназ и оксидаз, включая исследуемый фермент TcGAL. В обзоре также подробно рассмотрен мицеллярный подход как один из главных инструментов для изучения мембранных ферментов. Содержание обзора литературы полностью соответствует экспериментальной части работы и, безусловно, необходимо для её понимания. Обзор написан грамотно и подробно, что позволяет лучше оценить значимость результатов, изложенных в работе.

В разделе «Материалы и методы» довольно подробно описаны все реактивы, экспериментальные подходы и конкретные протоколы. Высокий уровень владения автором всеми использованными при выполнении работы методами биоинформатики, биохимии и аналитической химии не вызывает сомнений.

Глава Результаты и их обсуждение разделена на 6 подглав.

В первой части этой главы описана разработка эффективной методики определения активности TcGAL и гомологичного модельного фермента L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) с использованием системы обращённых мицелл и комбинации электроноакцептора и красителя, обесцвечивающегося при взаимодействии с продуктом реакции. Автором убедительно продемонстрированы преимущества разработанной методики по сравнению с ранее использовавшейся, в частности, отсутствие побочных реакций с участием электроноакцептора и возможность работы при pH-оптимуме обоих ферментов.

Вторая часть этой главы посвящена изучению влияния состава мицеллярной матрицы на каталитические свойства TcGAL и AtGALDH. Установлено, что структура и заряд мицеллообразующего ПАВ (анионный AOT, катионный ЦТАБ или нейтральный

Бридж-96) существенно влияли на олигомерный состав обоих ферментов, а добавление природных компонент мембран (фосфолипидов) приводило к образованию белок-липидных комплексов и усилению активности при высоких степенях гидратации. Полученные результаты позволили автору охарактеризовать функционирование TcGAL и AtGALDH в условиях, приближенных к таковым в природной мембране.

В третьей части главы проведен анализ ряда потенциальных ингибиторов TcGAL, в частности, АПАБ (соединения ряда аллилбензолов и халконы). Установлен ингибирующий эффект АПАБ и аллилбензолов и идентифицированы общие для изучаемых соединений структурные фрагменты (аллильная и метокси-группы), которые обуславливают их ингибирующие свойства. С использованием трифенилфосфониевого фрагмента, применяемого в литературе для селективной доставки лекарств в митохондрии, автору удалось повысить ингибирующий эффект АПАБ. Причину усиления ингибирования конъюгатов АПАБ по сравнению с немодифицированными АПАБ автор объясняет концентрированием конъюгатов на границе раздела фаз, что было подтверждено методом ИК-спектроскопии. Кроме того, использование TcGAL и модельного AtGALDH позволило автору установить, что АПАБ в большей степени влияли на оксидазную составляющую обоих ферментов, чем на дегидрогеназную, а также продемонстрировать ингибирование не только в мицеллярной, но и в водной среде.

Заключительная часть **Главы Результаты и их обсуждение** посвящена изучению влияния электроноакцепторов и активаторов на активность TcGAL и AtGALDH. Автором продемонстрирована возможность использования соединений ряда 1,4-бензохинона в качестве электроноакцепторов обоих ферментов как в водной, так и в мицеллярной средах. Кроме того, впервые найдены активаторы TcGAL – природные флавоноиды кверцетин и дигидрокверцетин. Данный результат может помочь лучше понять механизм функционирования этого фермента в присутствии природных соединений.

В целом, **Глава Результаты и их обсуждение** отлично структурирована, очень логично написана и проиллюстрирована большим количеством цветных рисунков и таблиц. Все это позволяет получить полное представление о достаточно большом объеме проведенных автором экспериментов и тщательном анализе полученных результатов. Таким образом, безусловной заслугой автора являются безупречная логика, аккуратность и последовательность в планировании и проведении экспериментов, а также тщательное обсуждение полученных результатов.

В Заключении диссертации автором также четко сформулированы выводы.

Степень достоверности полученных результатов. Исследование выполнено на высоком научном и методическом уровне с применением самых современных методов исследования. Выводы диссертации сформулированы четко и логически вытекают из результатов проведенного исследования. Научные положения, выносимые на защиту, полностью отражают основные результаты диссертационного исследования. В этом отношении достоинства работы не вызывают никакого сомнения.

В целом как диссертационная работа, так и автореферат Чудина А.А. написаны грамотно и проиллюстрированы достаточно большим количеством схем, фотографий, цветных рисунков и таблиц.

Из работы также следует, что автором выполнен достаточно большой объем исследований с применением самых современных физико-химических методов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При прочтении диссертации возникло несколько вопросов и комментариев, в частности, нужно отметить следующие :

1. Цитохром С, будучи природным электроакцептором TcGAL, имеет более выгодные параметры для измерения активности фермента, в частности, например, большее соотношение сигнал/фон и разницу коэффициентов молярного поглощения по сравнению с используемым в данной работе искусственным электроакцептором (феназинметосульфатом). Почему в работе автор использовал именно искусственный электроакцептор, а не природный?
2. Вопрос по эффекторам, которые, как показано в работе, усиливали каталитическую активность TcGAL. Из текста не совсем понятно, как автор определял, являются ли исследуемые соединения электроакцепторами или активаторами для фермента TcGAL.
3. При добавлении фосфолипидов, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, к TcGAL и AtGALDH автором была отмечена тенденция к увеличению каталитической активности ферментов при высоких степенях гидратации ($W_0 > 30$). Как, по мнению автора, можно объяснить эти изменения активности?
4. В работе показано, что феназинметосульфат (электроакцептор) сам по себе имеет достаточно большую разницу коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм, чтобы измерять активность как AtGALDH, так и TcGAL. Тем не менее автор использует электроакцептор в сочетании с красителем 2,6-дихлорфенолиндифенолом. Не совсем понятно, в чём преимущества этой комбинации в сравнении с использованием только электроакцептора?
5. В работе встречаются опечатки, неудачные выражения.

Все указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, а некоторые из них носят характер пожелания.

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", в частности, 2 статьи в журнале Биотехнология, две – в Biochemistry (Moscow), две статьи в журнале Биоорганическая химия, одна статья в Mendeleev Communications и одна статья в журнале Analitica (MDPI). Кроме того, полученные результаты представлены в 12 тезисов докладов на конференциях. Публикации полностью отражают содержание работы.

Заключение

Таким образом, 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

5