

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Владимира Израилевича Муронца на диссертационную работу Анастасии Александровны БАТАЛОВОЙ «МОДУЛЯЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнений. Сывороточные альбумины следует изучать хотя бы по той причине, что они являются одними из основных белков крови и, следовательно, уже по этой причине должны выполнять важные, возможно, неизвестные до сих пор функции. Интересен аспект multifunctionality альбуминов, в частности, их эстеразная активность, которой и посвящена данная работа. Кроме того, доступность этих белков и их стабильность, обусловленная множественными дисульфидными связями, делает альбумины популярным носителем различных лекарственных соединений, на свойства которых может существенно влиять эстеразная активность альбуминов.

Цель и задачи работы хорошо и адекватно сформулированы в диссертации и автореферате, а основные научные положения, выносимые на защиту, диссертантом полностью обоснованы.

Достоверность полученных результатов подтверждается, прежде всего, подробным изложением всех использованных методов в соответствующем разделе, грамотной статистической обработкой, а также публикацией основных результатов в рецензируемых журналах.

Научная новизна диссертации заключается в том, что прямыми методами с использованием ядерно-магнитного резонанса доказано, что сывороточный альбумин может катализировать истинную эстеразную реакцию. Новыми являются данные о роли альбумина в превращении ксенобиотиков, а также обширная информация об аллостерической регуляции каталитических центров альбумина. Новыми и важными представляются данные об особенностях функционирования сывороточных альбуминов из разных источников, поскольку этот аспект имеет существенное прикладное значение, прежде всего, для фармакологии.

Структура и содержание работы. Диссертация изложена на 147 страницах, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, нескольких разделов с представлением результатов собственных исследований и их обсуждения, заключительного раздела, в котором суммированы основные результаты и приведены выводы, а также списка литературы, который включает 167 процитированных статей. Диссертация хорошо иллюстрирована 17 таблицами, 35 рисунками и 2 схемами.

Обзор литературы написан очень хорошо и читается легко, с интересом. Вместо часто встречающихся обзоров с описанием противоречивых результатов без какого-либо внятного объяснений этих противоречий, автор написал полноценную работу, в которой рассмотрены основные проблемы, встающие перед исследователями белков, обладающих побочными каталитическими функциями, а также подходы, которые эти проблемы позволяют решить. Белки с побочными функциями, в том числе с каталитическими, привлекают все большее внимание и даже получили специальное название «Moonlighting Proteins», то есть белки подработки, как люди, «подрабатывающие лунными ночами». С такими белками всегда возникает вопрос о специфичности обнаруженной функции. Часто от такой функции, например, в случае невысокой каталитической активности, отмахиваются и считают ее чем-то неспецифическим и не имеющим никакого значения. Однако, особенно при высокой концентрации белка, обладающего дополнительными активностями, не учитывать такое свойство белков неправильно.

Экспериментальный раздел написан так же хорошо, как и диссертация в целом. Подробно и с грамотным анализом результатов. Очень разумное сочетание экспериментальных биохимических и энзимологических методов с проведением молекулярного моделирования. Даже некоторое расхождение полученных с помощью двух подходов результатов не умаляет ценности проведенных исследований, а скорее наоборот, вызывает большее доверие к выводам, которые делает автор. Наиболее впечатляющие результаты были получены с помощью метода ядерно-магнитного резонанса. Именно с использованием этого подхода, которые нечасто встречается в энзимологических работах, удалось доказать наличие у альбумина истинной эстеразной активности. Более того, автору удалось с помощью молекулярного моделирования установить в каком именно сайте альбумина эта реакция осуществляется. Мне кажется, что это основное и самое важное достижение диссертанта. Однако и остальные результаты весьма интересны - характеристика двух центров, на которых может происходить расщепление субстратов, информация об аллостерической регуляции альбумина, наблюдения о роли альбумина в детоксикации фосфорорганических

соединений. Важен также раздел, касающийся возможной роли окисления цистеинового остатка альбумина в регуляции его каталитических свойств. Отдельного внимания заслуживает информация об особенностях функционирования сывороточных альбуминов из разных источников. Действительно, без таких сведений трудно прогнозировать, как будет функционировать альбумин в организме человека, если проводить исследование *in vitro* на доступном бычьем альбумине и изучать фармакинетику на мышах или крысах. Хотелось бы, конечно, чтобы в дальнейшем результаты, полученные *in silico* на разных альбуминах, были бы подтверждены на изолированных белках. Таким образом, несомненно, что в результате проведенных исследований автору удалось получить важные, новые и достоверные результаты, что подтверждается его достойной публикационной активностью.

При ознакомлении с диссертацией возникли следующие замечания и вопросы.

1. Как уже было отмечено выше, обзор литературы написан очень хорошо с необходимым подробным и критическим анализом работ предшественников. Но мне не хватило в нем сравнительного анализа, хотя бы краткого, каталитических характеристик сывороточного альбумина с характеристиками каталитических антител и искусственных ферментов. Мне кажется, что по своим свойствам сывороточный альбумин ближе к этим белкам, а не к настоящим ферментам. Особенно было бы интересно сравнить каталитическую эффективность альбумина в отношении фосфорорганических соединений с эффективностью каталитических антител, созданных специально для разрушения этих ядовитых веществ.
2. На рисунке 3.6 представлены не только мономеры, но и олигомеры альбумина, причем и в присутствии дитиотреитола. Судя по всему, электрофорез проводился в присутствии додецилсульфата натрия и, следовательно, их наличие следует пояснить. Непонятно, зачем приведена крайняя левая дорожка с маркерами.
3. Для доказательства отсутствия примесных белков в препарате альбумина предпочтительно было бы провести вестерн-блоттинг с использованием специфических антител к этому белку. Возможно, что минорные полосы на рис. 3.6 являются не чужеродными белками, а продуктами протеолиза альбумина. Можно было бы также попробовать провести электрофорез в нативных условиях и осуществить эстеразную реакцию белком, элюированным из полосы, соответствующей альбумину.

4. Следовало бы обсудить отсутствие ингибирующего действия ингибиторов других эстераз в отношении эстеразной активности альбумина.
5. При восстановлении альбумина дитиотреитолом в выбранных условиях авторы определяют 1,27 сульфгидрильных групп на молекулу белка вместо одной и объясняют этот эффект примесью дитиотреитола. При правильном проведении эксперимента такие примеси в препаратах не остаются. На мой взгляд, более логичным представляется появление свободных сульфгидрильных групп из-за частичного восстановления дисульфидных связей. Этим, кстати, можно объяснить некоторые противоречия результатов *in silico* и *in vitro*, о которых сказано ниже.
6. Есть некоторые противоречия данных молекулярной динамики и экспериментов *in vitro* (согласно данным *in silico*, окисление тиоловой группы Cys34 альбумина слабо влияет на взаимодействие субстрата с сайтом Садлоу II). Может быть, это связано с неоднозначностью экспериментов *in vitro*, поскольку в препаратах альбумина молекулы белка могли содержать остатки цистеина разной степени окисления (до сульфеновой или сульфиновой кислоты) и даже молекулы с восстановленными дисульфидными связями. А моделирование проводили с полностью идентичными молекулами белка.
7. Сделанные выводы слишком подробные и развернутые. Это скорее абстракт работы.
8. Последние замечания касаются влияния английского языка на написание русских текстов. В списке сокращений сначала должны идти русские названия, как правильно сделано в списке литературы. И, конечно, в десятичных дробях следует использовать запятые, а не точки.

Заключение. В диссертационном исследовании Баталовой А.А. содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития биохимии. Диссертация представляет собой завершённое научное исследование, выполненное автором самостоятельно и на высоком уровне. Полученные автором результаты являются новыми, обоснованными и достоверными. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

По актуальности, объёму выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных данных представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г.

№842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Баталова Анастасия Александровна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент: заведующий отделом биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

доктор биологических наук, профессор

Владимир Израилевич Муронец



12.12.2022

Контактные данные:

Адрес: Москва, 119992, Ленинские горы, дом 1, строение 40,

рабочий e-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

рабочий телефон: +7(495) 939-14-56,

Специальность, по которой официальным оппонентом была защищена диссертация:

1.5.4 – Биохимия

Подпись В.И. Муронца заверяю

Директор научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова

академик, профессор

