

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл.,
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

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

д.ф.-м.н. Грабарник П.Я.



2022 г.

09.11.2022 № 191-01-2115/443
На № _____ от _____

О Т З Ы В

ведущей организации о диссертационной работе

Баталовой Анастасии Александровны

МОДУЛЯЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА,

представленной на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 1.5.4 – биохимия

Актуальность темы диссертационной работы. Основной целью диссертационной работы Анастасии Александровны Баталовой являлось изучение молекулярных механизмов гидролитической активности сывороточного альбумина. Основной упор в работе сделан на изучении эстеразной и псевдоэстеразной активности альбумина по отношению к фосфорорганическим соединениям (ФОС), которые широко используются в сельском хозяйстве и промышленности, а также могут применяться в качестве компонентов химического оружия нейротропного действия.

Главнейшей особенностью сывороточного альбумина является его способность к связыванию различных соединений (билирубин, мочевины, эстрадиол, глюкоза, жирные

кислоты и т.д.), обусловленная наличием у него набора центров связывания. Давно высказано предположение о том, что альбумин обладает гидролитической активностью и, в частности, эстеразной и псевдоэстеразной (необратимое ковалентное связывание субстрата с белком) активностью, т.е. некоторые центры связывания в альбумине являются, возможно, одновременно и центрами ферментативной активности. В то же время, молекулярные механизмы гидролитической активности альбумина далеко не изучены, и их изучение является актуальной задачей современной биохимии.

Связывание различных молекул одними центрами альбумина может изменять конформацию белка и аллостерически влиять на состояние других центров связывания, в том числе, и на ферментативную активность альбумина. Аллостерическая модуляция активности альбумина, особенно влияние модуляторов на взаимодействие альбумина с препаратами, довольно активно изучается в мире, однако возможность модуляции эстеразных свойств альбумина и ее возможное влияние на токсикокинетику ФОС исследованы недостаточно.

Принимая во внимание все вышесказанное, можно сделать заключение о том, что изучение молекулярных механизмов гидролитической активности сывороточного альбумина и факторов, влияющих на нее, является несомненно актуальной задачей современной биохимии, биофизики и практической токсикологии.

Научная новизна диссертационного исследования А.А. Баталовой определяется тем, что в нем впервые с помощью метода ЯМР продемонстрировано наличие у сывороточного альбумина истинно эстеразной активности. В работе А.А. Баталовой с применением биохимических и расчетных методов системно исследовано влияние различных модуляторов на связывающую и гидролитическую активность альбуминов разных видов по отношению к сложным эфирам и эфирам фосфорной кислоты. Кроме того, в работе установлено, что центр Садлоу I альбумина в большей степени подвержен аллостерической модуляции по сравнению с центром Садлоу II, а также показано, что влияние модуляторов на эстеразную активность альбумина имеет видовые особенности.

Значимость результатов исследования для науки и практики. Результаты диссертационной работы А.А. Баталовой имеют существенное значение как для фундаментальной науки, так и для прикладных разработок. Полученные результаты позволяют лучше понять механизмы функционирования такого важного белка крови как сывороточный альбумин. Знания о веществах, способных модулировать (усиливать/ослаблять) связывающую способность и/или эстеразную активность альбумина важны для разработки новых безопасных и эффективных препаратов для терапии различных заболеваний или токсических поражений организма. Обнаруженное в

работе ослабление связывания сложных эфиров альбумином в результате его окисления дает основание полагать, что воздействие окислителей должно ослаблять связывание альбумином ФОС и будет препятствовать доставке молекул отравляющего вещества к нейрональным и нейромышечным синапсам, что позволит снизить их токсичность для организма. Обнаружение того, что центр Садлоу I альбумина гораздо более подвержен аллостерической модуляции по сравнению с центром Садлоу II, указывает на то, что разрабатываемые новые препараты, взаимодействующие с центром Садлоу I, при тестировании нуждаются в более тщательной проверке взаимодействия лекарственных средств.

Анализ обоснованности и достоверности полученных данных. Работа А.А. Баталовой выполнена на высоком методическом уровне с использованием комплекса современных физико-химических (ЯМР, спектрофотометрия, электрофорез и т.д.) и теоретических (молекулярная динамика, молекулярный докинг, оценка свободной энергии связывания с использованием молекулярной механики и решения уравнения Пуассона-Больцмана) методов, а также статистических методов обработки экспериментальных данных. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Сформулированные А.А. Баталовой научные положения и выводы обоснованы и полностью соответствуют полученным результатам и поставленным задачам исследования.

Личный вклад автора. А.А. Баталова принимала участие во всех экспериментах, представленных в диссертации, занималась приготовлением образцов, проводила измерения, обрабатывала результаты измерений, выполняла вычислительные эксперименты. Часть работы была выполнена в сотрудничестве с коллегами из других научных институтов.

Рекомендации по использованию результатов работы. Результаты диссертационной работы А.А. Баталовой могут быть использованы в научной работе в области биохимии, фармакологии и токсикологии, а также в лекционных курсах для студентов, обучающихся по направлениям: биохимия, биофизика, медицинская физика, фармакология, токсикология.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, и 5 статей в журналах, входящих в базу Web of Science. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: XVIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, Рощино, 2017 г.; VI молодежная конференция по молекулярной

и клеточной биологии Института цитологии РАН, 2018 г., Санкт-Петербург; XX Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, Рощино, 2019 г.; VII молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 2020 г.; Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино, 2021 г..

Характеристика работы. Диссертационная работа изложена на 147 страницах, состоит из Введения, Обзора литературы, разделов Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Основные результаты и выводы, Список сокращений и Список литературы, включающий 167 источников. Работа содержит 35 рисунков, 17 таблиц и 2 схемы.

В обзоре литературы достаточно подробно рассмотрены имеющиеся в литературе данные об эволюционных, генетических и структурных особенностях сывороточного альбумина. Подробно описана трехмерная структура альбумина, особое внимание обращено на локализацию и структуру первичных и вторичных центров связывания эндогенных и экзогенных лигандов, центров связывания жирных кислот, а также металлсвязывающих центров. Приведены имеющиеся на начало работы данные по эстеразной и псевдоэстеразной активности сывороточного альбумина, а также по кинетике ферментативных реакций с участием альбумина. Обсуждена модуляция связывающей и ферментативной активности альбумина (аллостерические эффекты, влияние жирных кислот, полифенолов, редокс-соединений), а также видовые различия структурных и функциональных характеристиках альбумина. Отдельный раздел посвящен методам изучения связывающей и ферментативной активности альбумина (ЯМР-спектроскопия, спектрофотометрия, молекулярное моделирование).

Обзор литературы написан хорошим языком и хорошо иллюстрирован рисунками и диаграммами.

Экспериментальные физико-химические и теоретические методы, примененные диссертантом в ходе выполнения работы, достаточно подробно описаны в разделе «Материалы и методы».

Основная часть диссертации (Результаты и обсуждение) состоит из восьми основных частей: Эстеразная активность сывороточного альбумина по данным ЯМР; Поиск возможных сайтов истинно эстеразной активности БСА методами молекулярного моделирования; Влияние окисления тиоловой группы Cys34 на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина по отношению к НФА; Влияние окисления тиоловой группы ЧСА и БСА на их связывающие и эстеразные свойства по отношению к параоксону в эксперименте *in silico*; Влияние редокс-статуса сывороточного альбумина на его функциональные характеристики в условиях *in vivo*, *in vitro* и *in silico*:

сравнительный анализ; Влияние жирных кислот на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина; Влияние полифенолов на связывающую и эстеразную активность сывороточного альбумина; Определение влияния диазепама и карбоксима на скорость гидролиза НФА в присутствии БСА.

Основные итоги работы подведены в главе «Основные результаты и выводы». Одним из основных результатов проведенной работы является полученное методом ^1H ЯМР доказательство того, что сывороточный альбумин обладает истинно эстеразной активностью по отношению к НФА (*n*-нитрофенилацетат) и НФП (*n*-нитрофенилпропионат). Кинетические параметры реакции гидролиза НФА определяли спектрофотометрически, результаты обрабатывали в рамках модели ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен. В работе убедительно показано, что скорость образования продуктов гидролиза НФА и НФП в присутствии сывороточного альбумина быка (БСА) существенно выше, чем в случае их спонтанного гидролиза. Методами молекулярного моделирования показано, что центр Садлоу I БСА с каталитическим Tyr149 (Tyr150 в альбумине человека (ЧСА)) является наиболее вероятным кандидатом на роль эстеразного активного центра альбумина.

Установлено, что изменение редокс-статуса альбумина сопряжено с изменением сродства к эфирам. Показано, что окисление тиоловой группы Cys34 БСА влияет на сродство центров Садлоу I и II к НФА, увеличивая сродство первого и ослабляя сродство второго. При этом окисление этой тиоловой группы увеличивает V_{\max} (максимальная скорость реакции) центра Садлоу II и уменьшает V_{\max} центра Садлоу I, снижая тем самым эстеразную активность белка.

Показано, что жирные кислоты ингибируют эстеразную активность БСА в центре Садлоу I, в то время как в случае ЧСА и КСА (сывороточный альбумин крысы), олеиновая кислота оказывает неконкурентное ингибирующее влияние на псевдокаталитическую активность сайта Садлоу II. Молекулярное моделирование показало, что это ингибирование возникает, скорее всего, благодаря стерическим эффектам.

Установлено, что полифенолы увеличивают скорость гидролиза НФА альбумином в центре Садлоу I и в то же время слабо влияют на псевдоэстеразную активность центра Садлоу II, что согласуется с результатами молекулярного моделирования.

Показано, что антиконвульсант диазепам конкурентно ингибирует не только псевдоэстеразную реакцию в центре Садлоу II, но также эстеразную реакцию в центре Садлоу I.

Диссертантом сформулированы пять положений, выносимых на защиту, и пять выводов. Все они достаточно хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

Замечания и вопросы. Принципиальных замечаний по выполненному диссертационному исследованию нет.

Из текста диссертации следует, все эксперименты с использованием метода ЯМР и спектрофотометрии были проведены при 25°C. Возможно стоило бы провести хотя бы часть экспериментов при более «физиологической» температуре (37°C).

В экспериментах использовали фосфатный буфер, однако его концентрация не указана. Кроме того, не указано значение pH, при котором проводили эксперименты, а это важно, учитывая наличие у сывороточного альбумина pH-зависимых конформационных переходов.

Вызывает возражение неоправданное использование в тексте диссертации англицизмов: «сайт связывания», вместо «центр связывания»; «аффинность» вместо «сродство» и т.д.

Заключение. Диссертационная работа А.А. Баталовой является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук Гончарова Николая Васильевича, содержащей новое решение актуальной научной задачи, имеющей существенное значение для современной биохимии – обнаружение истинно эстеразной активности сывороточного альбумина, локализация центров эстеразной активности в молекуле альбумина и подробное изучение факторов, влияющих на эту ферментативную активность.

Диссертация полностью удовлетворяет требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 в действующей редакции), предъявляемым ВАК к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Анастасия Александровна Баталова, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Диссертация и отзыв были обсуждены, отзыв одобрен на семинаре Лаборатории новых методов в биологии Института биологического приборостроения с опытным производством РАН – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН» 3 ноября 2022 года, протокол № 2.

Главный научный сотрудник Института биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», д.б.н., профессор

Е.А. Пермяков

Подпись д.б.н. проф. Е.А. Пермякова заверяю:

Начальник отдела кадров ФИЦ ПНЦБИ РАН

Г.Н. Левченко

«09» ноября 2022 г.



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное название: Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Сокращенное название: ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Адрес: Проспект Науки, д. 3, г. Пушкино, Московская область, 142290

Телефон: 7 (4967) 73-26-36, 7 (4967) 73-86-20 доб. 1006.

e-mail: info@pbcras.ru ibp.ran@yandex.ru