

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Шмурака Владимира Игоревича
на тему «Сравнительный анализ связывающей и эстеразной активности
сывороточного альбумина человека, быка и крысы»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 «Биохимия»

Актуальность темы. То, что сывороточный альбумин выполняет транспортные функции, известно довольно давно, но ферментативная активность альбумина – феномен малоизвестный и даже немного экзотический. Однако логика эволюции состоит в том, что, с одной стороны, любой высокоспециализированной структуре, будь то молекула, клетка или орган, предшествует структура с низкой специализацией. С другой стороны, высокая специализация связана с риском гибели системы при более или менее значительном отклонении от стационарных условий. Устойчивость неравновесных систем обеспечивается оптимальным соотношением высоко- и низкоспециализированных структур, каждая из которых дополняет или даже заменяет другую при значительных флуктуациях условий окружающей среды. Если мы будем помнить об этих простых базовых принципах эволюции, то представления и рассуждения о ферментативной активности альбумина уже не будут казаться далекими от реальных проблем современной биологии и медицины. Изучение этой активности никогда не было приоритетом большой науки, но приоритеты далеко не всегда соответствуют реальной значимости и актуальности той или иной проблемы. В этой «неприметной» области исследований накопилось довольно много интересных фактов. Установлено, что альбумин выполняет целый ряд ферментативных функций: помимо карбоксилэстеразной активности альбумину присущи функции арилэстеразы, ариллациламидазы, тиоэстеразы,

супероксиддисмутазы, простагландин D-синтазы, глюкуронидазы, енолазы, ацетилсалицилат-деацетилазы, функции тиолпероксидаз (глутатион- и цистеинпероксидазы), а также группы фосфатаз (к ним относятся фосфомоноэстераза, фосфодиэстераза и подкласс фосфотриэстераз, представленный арилдиалкилфосфатазой, или параоксоназой, и диизопропилфторфосфатазой). Следует отметить и прооксидантные свойства альбумина: связанные с альбумином ионы меди Cu^{2+} усиливают образование аскорбат-радикала, молекулярный кислород и протоны окисляют образовавшиеся при этом ионы Cu^+ вновь до Cu^{2+} . Конечно, почти все эти виды активности альбумина невысоки, но его низкая активность компенсируется его высоким содержанием в плазме. Здесь следует отметить одну из недавних работ, свидетельствующих о тесной взаимосвязи уровня альбумина, наряду с уровнем орозомукоида, липопротеидов очень низкой плотности и цитрата, с вероятностью летального исхода для больных вне зависимости от характера их заболевания (Fischer et al., 2014).

Так что настало время для существенной переоценки роли альбумина, но оказалось, что практически ничего не известно о межвидовых отличиях, а ведь это важно как с теоретической, так и с практической точек зрения: если они существуют, то их необходимо учитывать при проведении экспериментальных исследований, доклинических и клинических испытаний. Тот факт, что в плазме крови человека нет карбоксилэстераз, а в плазме крови грызунов карбоксилэстераз очень много, имеет огромное значение при проведении лабораторных исследований. В плазме крови быка также отсутствуют карбоксилэстеразы, но как раз бычий альбумин является наиболее популярным вследствие своей дешевизны компонентом буферных систем и растворов для перфузии. Совокупность этих и других фактов определяет высокую актуальность темы диссертационного исследования В.И. Шмурака.

Обоснованность научных положений и выводов. Цель работы состояла в исследовании *in vitro* и *in silico* связывающей и эстеразной активности сывороточного альбумина человека, быка и крысы. Научные положения, выносимые на защиту, так же как и выводы, сформулированные по результатам диссертационного исследования, обоснованы и логично связаны с целью исследования и полученными данными. Обоснованность положений и выводов диссертации подкрепляются большим по объему и значительным по содержанию материалом исследования с использованием современных биофизических и биохимических методов исследования, а также математического аппарата в тесной связи с глубокой аналитической проработкой полученных данных.

Научная новизна. На основании глубокого анализа литературы, а также результатов собственных биохимических исследований *in vitro* в сочетании с данными молекулярного моделирования *in silico* предложена и обоснована математическая модель для описания эстеразной активности альбумина. В результате проведенного исследования определены кинетические и равновесные константы трех видов альбумина (быка, человека и крысы) с использованием биохимических методов в сочетании с методами молекулярного моделирования. В экспериментах *in vitro* биохимическими методами установлено, что сайт Садлоу I альбумина крысы обладает максимальной каталитической эффективностью по отношению к *n*-нитрофенилацетату, тогда как сродство сайта Садлоу II бычьего альбумина к *n*-нитрофенилацетату выше по сравнению с альбумином крысы и человека. В то же время, по отношению к параоксону каталитическая эффективность сайта Садлоу I максимальна у бычьего альбумина, в десятки раз превышая каталитическую эффективность альбумина крысы и человека. Эти данные, а также данные, полученные с применением специфических ингибиторов, убедительно доказывают, что характеристики сывороточного альбумина крысы и человека гораздо ближе между собой, но существенно отличаются

от характеристик бычьего альбумина. Кроме того, установлено, что фосфорилирование сайта Садлоу II всех трех видов альбумина при взаимодействии с параоксоном происходит быстрее ацетилирования этих сайтов. Дополнительные исследования кинетики взаимодействия с альбумином высокотоксичного зомана с применением метода косвенной оценки активности альбумина через определение остаточного ингибирования ацетилхолинэстеразы позволили диссертанту высказать предположение о преимущественно транспортных функциях сайта Садлоу II при токсикологически релевантных концентрациях зомана.

Методами *in silico* изучены процессы взаимодействия альбумина с п-нитрофенилацетатом, параоксоном, стереоизомерами зомана, специфическими ингибиторами сайтов Садлоу I и II. Установлено, что фосфорорганические соединения - в частности, P(-) изомеры зомана, обуславливающие его высокую токсичность, и оптически неактивный параоксон - могут продуктивно взаимодействовать с сайтом Садлоу I альбумина; помимо Tyr150 и Tyr411 альбумина человека, с зоманом могут продуктивно взаимодействовать Ser193 и Lys402. В то же время, данные молекулярного моделирования свидетельствуют о более высоком сродстве нетоксичных P(+) изомеров зомана к Tyr411 в сайте Садлоу II. Анализ реципрокного влияния основных сайтов альбумина при взаимодействии с негидролизуемыми лигандами - ибупрофеном и варфарином - позволил установить высокую селективность ибупрофена к сайту Садлоу II, но низкую селективность варфарина к сайту Садлоу I.

Достоверность полученных результатов. Диссертант в своей работе применил как традиционные, так и современные методы биохимического анализа, с использованием информации, полученной из специализированных баз данных. Данные экспериментальных исследований, проведенные на высоком методологическом уровне, в сочетании с современными методами

статистического анализа позволили обеспечить высокую степень достоверности полученных результатов, положений и выводов.

Значимость для науки и практической деятельности. Проведенный автором сравнительный анализ альбуминов разных видов животных и выявленные структурно-функциональные особенности открывают возможность для более грамотного планирования экспериментальных исследований, в том числе доклинических испытаний, адекватной оценки экспериментальных данных с учетом видовой специфики. Поскольку функциональные характеристики альбумина крысы и человека ближе между собой, в экспериментальных моделях *in vitro* необходимо использовать альбумин человека, а не более дешевый бычий альбумин. А при работе *ex vivo* с плазмой или сывороткой грызунов необходимо использовать ингибиторы карбоксилэстераз. Предложенная схема и математическая модель для описания эстеразной активности альбумина позволяет описывать сложные с функциональной точки зрения ферменты или квазиферменты, имеющие в своей структуре несколько разных сайтов, обладающих ферментативной или псевдоферментативной активностью. Автор внес существенный вклад в разработку и совершенствование методологии сочетанного анализа *in silico* и *in vitro*, что позволит всесторонне и более полноценно исследовать белковые структуры, проводить доклинические исследования фармпрепаратов, находить способы направленного воздействия на определенные сайты или молекулу альбумина экзогенными и эндогенными лигандами, повышая эффективность терапии.

Результаты диссертационного исследования В.И. Шмурака могут быть использованы в других научных учреждениях, которые занимаются разработкой лекарственных препаратов, их испытанием, а также вопросами безопасности и гигиенического регламентирования. Среди них - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Всероссийский научный центр по безопасности биологически

активных веществ, Институт экспериментальной медицины, НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Институт токсикологии ФМБА России, Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. Кроме того, результаты исследования можно включить в программы преподавания биохимии, биофизики, фармакологии и токсикологии.

Структура и содержание работы. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, шести разделов с представлением результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает в себя 208 источников, из них 10 – отечественные и 198 – зарубежные. Диссертация включает 40 рисунков и 26 таблиц, изложена хорошим профессиональным и литературным языком. Автореферат и публикации достаточно полно отражают содержание диссертационной работы. Основные результаты работы отражены в 15 научных публикациях, из них 10 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

В литературном обзоре дана общая характеристика альбумина, представлены сведения об эстеразной и псевдоэстеразной активности альбумина, описаны структура и принципы токсического действия фосфорорганических соединений (ФОС), имеющиеся данные о взаимодействии альбумина с ФОС, охарактеризованы методы молекулярного моделирования. Обзор написан хорошим литературным языком, охватывает историческую ретроспективу, хорошо иллюстрирован.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы биохимического анализа и методы молекулярного моделирования.

В главе «Результаты и обсуждение» дана сначала предварительная оценка связывающей и эстеразной активности альбумина, затем последовательно представлено сравнительное исследование связывающей и эстеразной активности альбумина человека, быка и крысы с *n*-

нитрофенилацетатом в качестве субстрата, сравнительное исследование связывающей и эстеразной активности альбуминов человека, быка и крысы с параоксоном в качестве субстрата, исследование связывающей и эстеразной активности альбумина с зоманом в качестве субстрата, проведен поиск сайтов, ответственных за эстеразную активность альбумина, методами молекулярного моделирования, и в заключительной части этого раздела представлен сравнительный анализ *in silico* связывания параоксона с сывороточным альбумином человека и быка.

В главе «Заключение» проводится краткий анализ представленных данных, после чего следуют выводы.

Замечания и вопросы. Существенных замечаний по объему, содержанию и оформлению диссертационной работы нет, однако при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы:

- 1) Вывод о консерватизме сайта Садлоу II по отношению к сайту Садлоу I всех исследованных видов альбумина достаточно обоснован и понятен, но что имеет в виду автор, говоря о консерватизме бычьего альбумина по отношению к альбумину крысы и человека?
- 2) Можно ли по выявленным свойствам альбумина трех видов животных предсказать, какой из них будет более чувствителен к отравлению фосфорорганическими соединениями?

Заключение. В диссертационном исследовании В.И. Шмурака содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития теоретических представлений и практических методов работы с альбумином и другими белками, имеющими несколько активных центров и обладающими неспецифическими ферментативными функциями. Эти знания необходимы, в частности, при проведении доклинических испытаний, фармако- и токсикокинетических исследований. По актуальности, объему 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, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а его автор, Шмурак Владимир Игоревич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент,

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ангиопатологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Орехов Александр Николаевич



(подпись)

18 мая 2018 г.

