

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование Шмурака Владимира Игоревича, выполненное под руководством доктора биологических наук Гончарова Николая Васильевича посвящено изучению функций мажорного белка сыворотки крови млекопитающих – альбумина. Основные функции сывороточного альбумина, такие как транспорт эндогенных и экзогенных соединений и поддержание осмотического давления, известны довольно давно и хорошо изучены. Ферментативная активность альбумина была показана не так давно, и на данный момент этот феномен малоизучен. Тем более нет исследований, посвященных межвидовому отличию характеристик связывания и активности альбумина. Тем временем такие исследования и полученные в них результаты необходимо учитывать при планировании токсикологических и фармакологических исследований на лабораторных животных, как на основном объекте доклинических испытаний. Этот факт, несомненно, определяет значительную актуальность темы диссертационного исследования Шмурака В.И.

Обоснованность научных положений и выводов

Научные положения, выносимые на защиту, обоснованы и логично связаны с целью исследования и полученными данными. Выводы, сформулированные по результатам диссертационного исследования, так же .

как и положения, выносимые на защиту, подтверждены большим объемом результатов полученных с использованием современных биофизических и биохимических методов исследования.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Соискателем проведен сравнительный анализ сывороточных альбуминов разных видов животных, и выявленные структурно-функциональные особенности необходимы для планирования экспериментальных исследований, в том числе доклинических испытаний фармакологических препаратов. Автор внес существенный вклад в разработку и совершенствование методологии сочетанного анализа *in silico* и *in vitro*, что, безусловно, даст возможность всесторонне и более полноценно исследовать белковые структуры, обладающие важной биологической активностью. В качестве примера можно привести то, как используя подобную стратегию, наряду с другими соединениями диссертант исследовал взаимодействие альбумина со стереоизомерами зомана, специфическими ингибиторами сайтов Садлоу I и II и показал, что высокотоксичные R(-) изомеры продуктивно взаимодействуют с сайтом Садлоу I, а, по результатам молекулярного моделирования, продемонстрировал существенно более значительное сродство нетоксичных R(+) изомеров к Туг 411 в сайте Садлоу II.

Владимир Игоревич предложил оригинальную схему и математическую модель для представления эстеразной активности альбумина, позволяющую описывать сложные с функциональной точки зрения белки, в структуре которых присутствует несколько разных сайтов, обладающих ферментативной или псевдоферментативной активностью.

Результаты диссертационного исследования В.И. Шмурака могут быть использованы при проведении доклинических исследований фармпрепаратов, токсикологических исследованиях, а также при разработке

новых соединений, модулирующих эффективность применяемой терапии, путем воздействия на альбумин как на мажорный белок сыворотки крови, изменяя его свойства.

Достоверность и объективность полученных результатов

Соискателем сформулированы пять научных положений, выносимых на защиту. Достоверность научных положений обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований, проведенных на высоком методологическом уровне, в сочетании с современными методами статистического анализа. Диссертант в своей работе применил как традиционные, так и современные биохимические и биофизические методы.

Структура и содержание работы

Диссертация Шмурака Владимира Игоревича состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Структура и форма изложения материала диссертационной работы соответствует требованиям ВАК. Работа изложена на 148 страницах. Библиографический список содержит 208 источников, из 198 работ зарубежных авторов. Важнейшие положения диссертационной работы иллюстрированы 40 рисунками и 26 таблицами. Основные результаты работы приведены в 15 научных публикациях, из них 10 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

В обширном литературном обзоре описаны научные достижения, начиная с середины XX века и заканчивая современными данными, так или иначе касающиеся эстеразной и псевдоэстеразной активности альбумина. Приведены современные сведения о принципах токсического действия фосфорорганических соединений (ФОС), а также имеющиеся данные о взаимодействии альбумина с ФОС. Описаны применяемые методы молекулярного моделирования.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы биохимического анализа и методы молекулярного моделирования. Хотелось бы особо отметить эффективное применение автором методов молекулярного моделирования и вполне адекватных версий программных продуктов HyperChem 8.0, Gromacs, Autodock4 в решении поставленных задач. К сожалению, до сих пор указанные методы весьма неуверенно применяют в анализе механизмов взаимодействия сложных эфиров с альбумином. Так, в единственной работе в этой области, выполненной десять лет тому назад, докинг проводился только в сайт связывания Tyr411, а метод молекулярной динамики вообще не использовался ее автором. В этом отношении представленная Шмураком В.И. диссертационная работа исключительна. В ней методом впервые молекулярного моделирования исследовано взаимодействие Tyr150 и Tyr411 альбумина с зоманом, включающее докинг в сайты Tyr150 и Tyr411 и проверку стабильности комплексов методом молекулярной динамики.

В главе «Результаты и обсуждение» приведены данные биохимических исследований, характеризующих связывающую и эстеразную активности альбумина с различными субстратами. Затем последовательно представлено сравнительное исследование связывающей и эстеразной активности альбумина человека, быка и крысы. Методами молекулярного моделирования проведен поиск сайтов, ответственных за эстеразную активность альбумина, 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, которые полностью соответствуют поставленным задачам и результатам настоящего исследования.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний к представленной диссертационной работе нет, однако при ознакомлении с научной работой возникли следующие вопросы:

1) Продуктивная сорбция зомана в активном центре возможна только после депротонирования каталитического тирозина. Хотелось бы узнать точку зрения диссертанта на то, за счет чего может происходить депротонирование указанного тирозина. Как известно рКа свободного тирозина составляет примерно 10. В связи с этим возникает вопрос о том, имеются ли данные о влиянии связывания альбумином субстрата на величину рКа тирозина, и если таковые имеются, то сколь значительно это влияние?

2) В диссертационной работе эксперименты *in vitro* проведены с тремя видами альбумина - с человеческим, бычьим и крысиным, в то время как расчеты *in silico* – только с человеческим и бычьим. Естественно возникает вопрос, почему не были сделаны расчеты *in silico* с крысиным альбумином. Можно предположить, что препятствием в этом случае стало отсутствие данных рентгеноструктурного анализа, в связи с чем автор прибег к построению трехмерной структуры анализу с помощью биоинформатики. Хотелось бы услышать о наиболее существенных деталях используемого им подхода и о дальнейших планах на завершение очень интересного расчетного эксперимента.

3) В работе диссертанта, по данным молекулярного моделирования сродство сайта Садлоу-1 к *n*-нитрофенилацетату выше, чем сродство сайта Садлоу-2, в то время, как по данным экспериментов *in vitro*, получается наоборот. Используя предложенную Вами очень оригинальную кинетическую схему, не могли бы Вы объяснить, с чем и в какой степени это может быть связано?

Заключение

Диссертационная работа Шмурака Владимира Игоревича, выполненная под руководством доктора биологических наук Гончарова Николая Васильевича, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей большое 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 своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных данных представленная диссертационная работа Шмурака Владимира Игоревича соответствует всем 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 соискатель заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.


Доцент с возложением обязанностей заведующего
кафедрой биохимии биологического факультета
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»,
кандидат биологических наук

 В.Е. Стефанов

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9

Телефон: +7(921)5539076

e-mail: V.Stefanov@spbu.ru

Личную подпись

Завещаю

