

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сутормина Олега Сергеевича *«Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение»*, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Исследование механизмов функционирования ферментов и ферментативных цепочек в условиях, приближенных к внутриклеточным, например, в условиях молекулярного краудинга или вязкого микроокружения, является основой для понимания высокоорганизованных процессов регуляции полиферментных процессов в многокомпонентной гиалоплазме реальной клетки. Изучение кинетических и термодинамических характеристик ферментов и их комплексов в условиях вязкого микроокружения позволит значительно улучшить степень понимания релевантных механизмов функционирования ферментов в условиях реальной клетки. При этом, моделирование внутриклеточного интерьера является актуальным научным направлением современной биофизики и в полной мере относится и к метаболическим процессам, происходящим в клетках светящихся бактерий. Несмотря на широкое использование биоломинесцентной биферментной системы - НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + бактериальная люцифераза, в фундаментальных и прикладных исследованиях, до сих пор не решенными являются вопросы о существовании комплекса между этими ферментами и корректности использования биферментной биоломинесцентной системы вместо светящихся бактерий в биотестировании. Таким образом, выявление закономерностей поведения ферментов в условиях, близких к внутриклеточным, является важным и актуальным не только для развития современной биологии в целом, но для более глубокого понимания явления – биоломинесценция.

В качестве объектов исследования были выбраны би- и триферментные системы, сопряженные с люциферазой светящихся бактерий. Сопряжение в использованных ферментативных системах происходит по молекуле – НАД<sup>+</sup> или НАДН. Исследование олигоферментных систем, различного уровня сложности, позволяет провести реконструкцию фрагментов метаболических цепочек, которые могут существовать в клетках моделируемого организма. Из множества физико-химических параметров клеточного микроокружения была выбрана вязкость. Различные значения вязкости внутриклеточной среды моделировались добавлением, в измерительную кювету, природных осмолитов - глицерина и сахарозы.

Целью диссертационной работы являлось выявление механизмов функционирования ферментов в би- и триферментативных цепях сопряжения с бактериальной люциферазой в условиях вязкого микроокружения, имитирующего внутриклеточную среду клетки, влияющих на чувствительность ферментативных биотестов. Основное содержание работы составляет обсуждение полученных вязкостных кинетических и температурных характеристик би- и триферментной систем, а также описание чувствительности ферментативных систем к антропогенным токсикантам. Спектрофотометрическими методами охарактеризованы спектры флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и бактериальной люциферазы в присутствии глицерина и сахарозы.

**Построение диссертации.** Диссертационная работа Сутормина О.С. имеет традиционную структуру: состоит из введения, 5 глав (обзор литературы, материалы и методы, три главы с результатами экспериментальных исследований), заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка цитируемой литературы (169 источников).

Во **введении** (стр. 6-12) диссертант обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цели и задачи работы, отмечает научную новизну, практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту, описывает личный вклад автора, достоверность и обоснованность результатов, апробацию результатов работы, приводит количество публикаций, структуру и объем работы.

**В главе 1 (обзор литературы)** (стр. 12-59) приведен обзор научной литературы, посвященный методам и подходам исследования внутриклеточного поведения ферментов путем внутриклеточного дизайна среды, на примере вязкости реакционной среды и молекулярного краудинга. Показана невозможность прямого использования кинетических и других характеристик функционирования ферментов, полученных в водно-буферных растворах (*in vitro*), для целей понимания внутриклеточного функционирования ферментов их систем и комплексов. Приведен анализ литературы, касающийся влияния вязкости реакционной среды на энергетические составляющие (энергия активации, термодинамические кооперативные эффекты) акта ферментативного катализа. Предоставлено подробное описание пространственных структур бактериальной люциферазы, НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и лактатдегидрогеназы. Приведены полученные ранее подходы для определения эффективности сопряжения ферментов в биферментной биолюминесцентной системе - НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + бактериальная люцифераза.

**В главе 2 (материалы и методы)** (стр. 60-73) описаны методы и методики проведенного исследования. Перечислено используемое в работе оборудование,

приведено описание его принципиального устройства, даны основные параметры, необходимые для интерпретации полученных данных.

**В главе 3** (стр. 74-82) представлены результаты исследований о влиянии вязкости реакционной среды (в диапазоне от 1 до 6,2 сП) на активность биферментной системы - НАДН:ФМП-оксидоредуктаза + люцифераза и триферментной системы - лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН- оксидоредуктаза + люцифераза. Отмечается, что исследованный диапазон значений вязкого микроокружения соответствует значениям цитоплазматической жидкости. Исследовано влияние вязкости реакционной среды на основные кинетические параметры двух, сопряженных с бактериальной люциферазой, ферментативных систем – величина максимальной интенсивности свечения, константа спада светоизлучения и общее количество высвеченных квантов света. Проведено сопоставление полученных данных о влиянии вязкости микроокружения с ранее полученными, другими исследователями, данными. Показано, что биферментная система менее чувствительна к вязкому микроокружению по сравнению с триферментной системой. В дополнение, водно-глицериновые растворы являются более предпочтительными растворами для моделирования внутриклеточных значений вязкости, чем водно-сахарозные.

**Глава 4** (стр. 83-96) посвящена обсуждению результатов изучения термостабильности би- и триферментной систем в условиях вязкого микроокружения. Приведены зависимости каталитической активности ферментативных систем в температурных диапазонах от 20 до 45 °С и от 15 до 80 °С для биферментной и триферментной системы, соответственно. Показано, что присутствие в реакционной среде 50% глицерина и 40% сахарозы приводит к повышению каталитической активности НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза системы при температурах выше 30 °С. Изучены спектры флуоресценции оксидоредуктазы и люциферазы при температуре 35 °С. Их форма показывает, что увеличение добавляемых концентраций природных осмолитов приводит к защите белковых глобул от воздействия критических температур. Проанализированы кривые термоинактивации биферментной и триферментной системы - процесс термоинактивации триферментной системы соответствует кинетике реакции второго порядка, а процесс термоинактивации биферментной соответствует кинетике реакции первого порядка.

Отдельный и существенный акцент делается на определение величины мнимой энергии активации в исследованных ферментативных системах. Показано, что в присутствии глицерина ферментативным системам свойственно более выгодное энергетическое состояние, чем в присутствии сахарозы.

**Глава 5** (стр. 97-113) содержит информацию о перспективах аналитического применения исследованных полиферментных систем, сопряженных с люциферазой, в качестве ферментативных биоломинесцентных тест-объектов. В первом разделе главы 5 описаны результаты исследования влияния коммерчески доступных одностенных и многостенных углеродных нанотрубок и химически модифицированного фуллерена на активность биферментной системы. По рассчитанным токсикологическим показателям ингибирования интенсивности свечения биоломинесцентной биферментной системы ( $IC_{50}$  и  $IC_{20}$ ) установлено, что биферментная система обладает наибольшей чувствительностью к многостенным углеродным нанотрубкам.

Второй раздел главы 5 содержит информацию о этапе исследования о влиянии, чистых и в последующем загрязненных пестицидами и тяжелыми металлами, образцов почв с различным содержанием гумуса (песок, легкий суглинок, средний суглинок, тяжелый суглинок, чернозем) на активность трех ферментативных систем (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза, НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза, лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза). Показано, что повышение сложности системы (от моно- до триферментной) в несколько раз увеличивает чувствительность ферментативного биотеста.

Автором диссертации была проделана большая работа по получению и обработке массива экспериментальных данных. Показано влияние вязкого микроокружения, моделируемое глицерином и сахарозой, на кинетические параметры сопряженных би- и триферментных систем. Продемонстрировано влияние природных осмолитов на термодинамические характеристики (термостабильность, величина энергии активации) двух сопряженных ферментативных систем. Важным научным результатом является новый критерий оценки эффективности сопряжения ферментов в олигоферментных системах, который, может являться доказательством того, что в клетках светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктазе и люциферазе свойственно наличие комплекса по переносу ФМНН<sub>2</sub> от НАДН:ФМН-оксидоредуктазы к люциферазе. Также, научную ценность представляют практические аспекты проведенного исследования, которые показали возможность применения биферментной системы в качестве тест-системы для определения потенциальной токсичности использования наноматериалов и наночастиц. Кроме этого, в работе заложены основы для формирования концепции комплексной оценки загрязнения почв, основанной на использовании набора ферментативных тестов.

Завершают работу заключение и основные выводы, которые соответствуют поставленным целям и задачам исследования и в полной мере отражают полученные диссертантом результаты.

Следует отметить большой объем полученных диссертантом экспериментальных данных и широкий круг использованных в работе современных методов и подходов для выявления механизмов функционирования ферментов в би- и триферментативных цепях в условиях вязкого микроокружения. Согласованность результатов, полученных разными методами, позволяет без сомнения считать приведенные в работе результаты **достоверными**.

Полученные в работе результаты без сомнения определяют **научную повизну** исследования, подтверждаемую полученными данными при изучении кинетических и термодинамических характеристик функционирования олигоферментных систем (би- и триферментных) в вязком микроокружении, имитируемым глицерином и сахарозой.

**Практическая значимость** рецензируемой работы состоит в разработке нового подхода для конструирования специализированных биолюминесцентных ферментативных биотестов различной сложности для целей мониторинга экологической безопасности сред различного компонентного состава и степени загрязнения. В работе показана возможность использования моно-, би- и триферментных систем в качестве тест-систем для оценки степени антропогенной нагрузки почв, различных классов, и токсичности наноматериалов, на примере однослойных углеродных карбоксилированных нанотрубок и многослойных углеродных нанотрубок.

В целом, диссертация Сутормина О.С. аккуратно оформлена и производит хорошее впечатление. Основные результаты достаточно полно отражены в 8 публикациях в рецензируемых научных российских и международных журналах.

Работа производит положительное впечатление, но при ознакомлении с ней возникли следующие вопросы:

1) Если сравнивать полученные результаты исследованной активности триферментной системы - лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза, в вязком микроокружении, с опубликованными ранее результатами исследования активности трех отдельных моноферментных реакций, катализируемых лактатдегидрогеназой, НАДН:ФМН-оксидоредуктазой и люциферазой, соответственно, то какой (или какие ферменты) вносят наибольший вклад в полученное, автором работы, значительное уменьшение каталитической активности системы в присутствии вязкого микроокружения?

2) Возможно ли использование критерия оценки эффективности кооперации ферментов для описания степени сопряжения ферментов в олигоферментных системах для задач ферментативного биотестирования, а не только внутриклеточного дизайна?

3) В главе 5 диссертации указано, «что для большинства исследуемых образцов почвенных токсикантов наблюдалось снижение ингибирующего воздействия токсических веществ на ферментативные системы при их внесении непосредственно в экстракты из почв», чем можно объяснить регистрируемое снижение ингибирующего воздействия почвенных токсикантов?

Указанные вопросы носят рекомендательный характер и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Можно отметить, что диссертация О.С. Сутормина является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для современных биофизики и биологии. Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, и свидетельствует о важном вкладе результатов диссертации в науку.

Считаю, что по уровню выполненных исследований, научной новизне и практической значимости рецензируемая диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и паспорту заявленной специальности 03.01.02 – биофизика, а ее автор Сутормин Олег Сергеевич заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент,

Ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии, кафедры микробиологии, биологического факультета, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

доктор биологических наук



Исмаилов Анвар Джураевич

« 9 » 09 2021 г.

Адрес: 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1 стр. 12.

м.т. +79169077758, раб. +74959395936

e-mail: anvaris@list.ru

Копия рецензии для А.С. Сутормина заверена  
и.и. Директор ФГУ «ВНИИВиС им. академика М.Ф. Иванов»

