

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук, профессора Камнева Александра Анатольевича на диссертационную работу Сутормина Олега Сергеевича «Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика

Актуальность темы

Диссертационное исследование Олега Сергеевича Сутормина посвящено изучению эффектов модельных вязких сред на многостадийные биохимические реакции. Известно, что ферментативные реакции во внутриклеточных условиях (*in vivo*) протекают под влиянием многих дополнительных факторов, которые, как правило, не учитываются при стандартных биохимических исследованиях ферментов «в пробирке» (*in vitro*). В частности, известно, что локальная вязкость внутриклеточной среды может превышать вязкость буферных водных растворов в 2–15 раз в зависимости от типа клеток и их физиологического состояния. При этом механизмы влияния вязкости на биохимические реакции не ограничиваются лишь замедлением диффузии субстратов и ферментов (кинетическими эффектами), но также включают изменение структурных и термодинамических характеристик белков, что, в свою очередь, сказывается на их активности. Таким образом, для понимания принципов работы такой сложной системы как живая клетка важно установить особенности функционирования ферментов в нетрадиционных средах (негомогенных, вязких, переполненных массивными инертными компонентами). Следует отметить, что в настоящее время внимание исследователей уделяется, главным образом, влиянию внутриклеточных условий на процессы сворачивания белков и реакции ассоциации макромолекул. Изучение взаимодействия компонентов полиферментных цепочек находится на начальном этапе накопления экспериментальных данных. Однако получение данных о функционировании олигоферментных систем в нетрадиционных средах является новым знанием для биологических наук, не имеющим близких аналогов, так как включает не только регистрацию каталитической активности ферментов, но и новые сведения о механизмах регуляции многостадийного, многосубстратного, полиферментного процесса в условиях, приближенных к внутриклеточным. В конечном итоге это может помочь реконструировать метаболические цепочки в условиях *in vitro*, а также создать ферментативные реагенты нового поколения для биодиагностики и разных видов биоанализа. Некоторые из этих проблем ставятся и решаются в представленной диссертации.

Структура диссертации и автореферата

Диссертация Сутормина О.С. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав с изложением результатов работы, заключения, выводов, списка публикаций по теме

диссертации, списка сокращений. Список цитируемой литературы насчитывает 169 источников, в том числе 149 зарубежных. Работа представлена на 141 странице и содержит 28 рисунков и 7 таблиц. Автореферат соответствует основным положениям и выводам диссертации, написан доступно, хорошо иллюстрирован.

Во Введении обоснована актуальность исследования ферментативных систем различной сложности, в том числе в средах, моделирующих внутриклеточное окружение; показаны научная новизна, практическая значимость, использованные методы исследования.

В Обзоре литературы представлены современные концепции и методы исследования регистрации активности моноферментных реакций при переходе от экспериментов в *in vitro* к условиям, близким к микроокружению реальной клетки (*in vivo*). Особое внимание уделяется доказательной базе того, что положения классической биохимии о функционировании ферментативных реакций, полученные в условиях *in vitro*, не подходят для описания поведения метаболических процессов во внутриклеточных условиях. Достаточно подробно проанализирована информация о влиянии вязкого микроокружения на пространственные и кинетические характеристики ферментативных реакций. Даны сведения о эффектах величины внутренней вязкости в белковых глобулах, которые могут сказаться на каталитической активности ферментов при проведении экспериментов в средах, имитирующих окружение реальной клетки. Отмечается, что до сих пор нет точного понимания механизмов влияния вязкости микроокружения на активность моноферментных реакций. Приводится описание современных моделей о структурном происхождении вязкостной зависимости ферментативных реакций. Большое внимание уделяется описанию структурных и кинетических характеристик биферментной биолюминесцентной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + бактериальная люцифераза и моноферментной системы, катализируемой лактатдегидрогеназой. Проанализированы полученные ранее другими авторами результаты исследований об активности бактериальной люциферазы и лактатдегидрогеназы в присутствии различных со-растворителей: ацетонитрил, ацетон, этанол, метанол, формамид, диметилсульфоксид, глицерин, сахароза и этиленгликоль. Раздел заканчивается логичной постановкой задачи, где подчеркивается, что изучение сопряженных би- и триферментных систем в негомогенных средах дает возможность для реконструирования фрагментов метаболических систем в вязком микроокружении для создания модели функционирования ферментов в гиалоплазме.

Раздел Материалы и методы полностью отражает все методологические подходы, используемые в работе. Даны характеристики использованного в работе оборудования и химических реактивов. Приведены методы измерения активностей би- и триферментных систем, сопряженных с бактериальной люциферазой, в присутствии глицерина и сахарозы. Описан метод биотестирования почвенных образцов, загрязненных ксенобиотиками, с использованием би- и триферментных систем.

Результаты и обсуждение представлены в трех взаимосвязанных главах №№ 3–5. В двух разделах главы 3 подробно описано влияние вязкого микроокружения на кинетическую активность биферментной системы (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментную систему (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза). Проведен анализ чувствительности исследованных ферментативных систем при варьировании вязкости реакционной среды в диапазоне от 1,2 до 6,2 сП путем добавления различных концентраций глицерина и сахарозы. Глава 3 заканчивается логичным выводом. Полученные параметры чувствительности к вязкости реакционной среды исследованных ферментативных би- и триферментных систем согласуются с результатами, опубликованными ранее другими авторами, по активности люциферазы и лактатдегидрогеназы в присутствии глицерина и сахарозы.

В главе 4 представлены результаты термостабильности би- и триферментной систем в условиях вязкого микроокружения. Интенсивность свечения биферментной системы измеряли в диапазоне температур от 20 до 45 °С, а для триферментной системы варьирование температуры проводилось в диапазоне от 15 до 80 °С. Главный результат главы 4 состоит в том, что увеличение вязкости реакционной среды приводит к существенному увеличению каталитической активности биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) системы при температуре 35 °С. На основании экспериментальных данных и анализа изменения энергии активации в исследованных ферментных системах предлагается новый критерий оценки адекватного конструирования ферментативных систем по изменению параметра термостабильности сопряженных ферментативных систем. Этот результат достигается логичной последовательностью экспериментальных подразделов главы 4.

В главе 5 приводятся результаты, описывающие перспективы использования би- и триферментной систем для оценки потенциальной токсичности наноматериалов и оценки степени загрязнения почв различными классами токсикантов. Проведенные исследования показали, что биферментная система (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) является более чувствительным тест-объектом для определения токсичности углеродных карбоксилированных нанотрубок, чем, например, методы тестирования, основанные на использовании клеток светящихся бактерий. Полученные результаты, посвященные биотестированию почвенных образцов, предлагают возможность увеличения чувствительности ферментативных биотестов к токсикантам в почве за счет удлинения цепи сопряжения ферментов. В дополнение показан потенциал конструирования специализированных ферментативных биотестов за счет различного действия экстрактов незагрязненных почв разных типов на исследованные ферментные системы.

В Заключении автор описывает перспективы научного и практического применения результатов диссертационной работы. Представленные выводы полностью обоснованы и не вызывают сомнений.

При ознакомлении с авторефератом (АР) и диссертацией (Д) как результатом цельного и комплексного исследования О.С. Сутормина возникли **два вопроса и замечание:**

1) Насколько исследованные в данной работе диапазоны величин вязкости реакционной среды соотносятся с реальными значениями внутриклеточного пространства в клетках светящихся бактерий?

2) С чем может быть связана бóльшая чувствительность ферментных систем к потенциальной токсичности наноматериалов по сравнению с клеточными культурами?

3) Несмотря на четкую структурированность и очевидную проработку текста, имеется ряд неточностей и опечаток (в том числе в пунктуации), включая неудачные и неправильные выражения: “в вязком микроокружении средах, имитируемым” (АР, с. 11, абз. 3, строка 4); “Гомогенность цитоплазмы ... вызывает возражения” (Д, с. 14, строки 4–5); “поведение ... будет другим, чем” (Д, с. 17, абз. 2, посл. строка); “гидратации свободной энергии” (Д, с. 34, строка 16); “в 0,7 раз меньше” (Д, с. 80, строка 2 снизу; АР, с. 12, строка 4 снизу) и др.

Указанные вопросы и замечание имеют дискуссионный характер, не умаляют достоинств данной работы и не ставят под сомнение обоснованность научных положений и выводов.

Диссертационная работа обладает научной новизной, а именно: впервые в результате изучения влияния вязкости реакционной среды, имитируемой добавлением различных концентраций глицерина или сахарозы, на активность биферментной и триферментной систем получены зависимости изменений кинетических (константа спада свечения, общее количество выделенных квантов света) и термодинамических характеристик (энергия активации, константа термоинактивации) метаболических ферментативных комплексов в зависимости как от длины цепи сопряженных ферментов, так и от вязкости микроокружения.

Практическая значимость результатов определяется формированием современных подходов для конструирования специализированных ферментативных биотестов различной сложности для целей мониторинга экологической безопасности сред различного состава и степени загрязнения. В исследовании разработаны биолюминесцентные биотесты для оценки токсичности почвенных образцов и наноматериалов, превосходящие известные методы анализа. Практически значимым является и обнаруженный для биферментной системы эффект увеличения термостабильности и интенсивности свечения при увеличении вязкости среды.

Научные положения и выводы диссертационной работы О.С. Сутормина базируются на обширном экспериментальном материале. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных адекватных методов; достоверность результатов, благодаря использованному арсеналу методов и грамотной статистической обработке результатов при проведении экспериментов, не вызывает сомнений. Основные результаты диссертации опубликованы в 25 научных работах, включая 8 статей в рецензируемых международных и российских журналах, что превышает формальные требования ВАК.

Заключение

Диссертационная работа О.С. Сутормина «Би- и триферментные системы, сопряженные с бактериальной люциферазой, в вязком микроокружении: биофизические характеристики и применение» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для молекулярной биофизики и биологии. Рецензируемая диссертация отвечает 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, а ее автор **Сутормин Олег Сергеевич заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.**

Официальный оппонент

ведущий научный сотрудник Лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

профессор, доктор химических наук  Александр Анатольевич Камнев

«06» сентября 2021 г.

Адрес: 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13
моб.тел.: +7(917)2184118, раб.тел.: +7(8452)970444
e-mail: a.a.kamnev@mail.ru

Подпись в.н.с., проф., д.х.н. А.А. Камнева заверяю:

Ученый секретарь ИБФРМ РАН



О.Г. Селиванова