

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Н.Г. Петросян
“Связывание ДНК-специфических лигандов метиленового синего и Hoechst 33258
с сывороточным альбумином”, представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.02 – “Биофизика, биоинформатика”.

Исследования последних десятилетий показывают, что существенную роль во многих процессах, происходящих в организме, играет природный транспортный белок крови – альбумин. В этой связи большой интерес вызывают исследования взаимодействия альбумина небольшими биологически активными соединениями, лигандами, влияющими на биодоступность и эффективность лекарственного препарата *in vivo*. Исследование связывания с альбумином подобных низкомолекулярных соединений *in vitro* позволяет выявить молекулярные механизмы структурных изменений в белке под их влиянием. Выяснение этих особенностей может стать основой для разработки новых лекарственных препаратов.

В данной работе в качестве биологически активных лигандов рассмотрены два красителя: метиленовый синий (МС) и Hoechst 33258 (Н33258). Оба являются лигандами, которые проявляют специфичность к связыванию с нуклеиновыми кислотами. Метиленовый синий наиболее известен как фотосенсибилизирующий агент для фотодинамической инактивации РНК-вирусов, включая ВИЧ, вирус гепатита В и вирус гепатита С в плазме. В основе фоточувствительности МС лежит его способность образования синглетного молекулярного кислорода из обычного кислорода воды под действием света. С ДНК он может связываться двумя механизмами: интеркаляцией и внешним связыванием.

Hoechst 33258 (Н33258) является связывающимся с ДНК потенциально противоопухолевым лекарственным препаратом. Показано, что Н33258 и его производные обладают радиопротекторными свойствами, чем и обусловлено широкое внимание исследователей к этому лиганду. Н33258 связываются в АТ-богатых участках малого желобка ДНК.

Диссертационная работа Н.Г. Петросян состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 120 страницах текста, содержит 6 таблиц и 22 рисунка. Список цитированной литературы включает 155 источников.

Первая глава посвящена обзору литературы, где подробно представлены данные о структуре белка альбумина крови человека, быка и крысы, о функциональном значении этого белка, о денатурации белка, как метода определения функциональных особенностей этой макромолекулы, а также представлены данные по взаимодействию различных лигандов с ним. Отдельный раздел посвящен данным о биологической активности ДНК-специфических лигандов метиленовый синий (МС) и Hoechst 33258 (Н33258) с альбумином. Ознакомление с этой главой оставляет благоприятное впечатление об осведомлённости диссертанта в выбранной области исследования.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования. В этой главе приводятся технические характеристики использованных препаратов и буферных растворов. Дается подробное описание использованных методов исследования структуры альбумина и ДНК, а также их комплексов с лигандами: это методы абсорбционной, дифференциальной и флуоресцентной спектроскопии. Детально описан метод температурной денатурации, а также статистическая обработка результатов исследования.

Использованные методы являются достаточно информативными и взаимодополняющими для исследований структурных перестроек в биологических макромолекулах при связывании с лигандами, что позволяет получить достоверные данные об исследуемых системах.

Третья глава посвящена результатам исследования и их обсуждению. В этой главе получены результаты, которые являются пионерскими. Впервые на основании данных исследования кривых УФ-денатурации и анализа дифференциальных спектров комплексов альбумина с исследуемыми лигандами показано, что связывание с Н33258 приводит к уменьшению температуры плавления, исходя из которого автор делает убедительный вывод, что вследствие разворачивания пространственной структуры белка и потери α -спиральности имеет место дестабилизация альбумина. Аналогичные исследования, проведенные для комплексов альбумина с МС, показывают увеличение температуры плавления, что свидетельствует о стабилизации структуры белка, возможно, из-за дополнительного фолдинга, вызванного локализацией МС во внутренней полости белка.

Поскольку исследуемые лиганды широко известны как ДНК-специфичные, в работе также проводилось сравнение с их взаимодействием с ДНК. Такой подход дал

возможность автору прийти к заключению о возможных механизмах их взаимодействия с белком альбумином.

В работе проводилось также исследование спектров флуоресценции МС и Н33258 при титровании альбумином. Показано, что добавление альбумина приводит к тушению флуоресценции обоих лигандов. По спектрам флуоресценции альбумин-лиганд комплексов, снятым при 3 различных температурах, были рассчитаны изменения энтальпии, энтропии и потенциала Гиббса в результате связывания. Термодинамический анализ этих данных позволяет автору охарактеризовать энергетику процесса связывания и прийти к выводу, что процесс связывания энергетически выгоден, и происходит за счет существенных энтальпийных эффектов, хотя энтропийно он невыгоден.

Таким образом, проведенные диссертантом исследования и полученные данные выявили, что альбумин может играть важную роль в направленной транспортировке ДНК-специфических лигандов до мишени.

К работе есть следующие замечания:

1. Неясно, что имеет ввиду автор, когда, исходя из кривых плавления комплексов альбумина и метиленового синего, утверждает, что метиленовый синий, связываясь с альбумином, не проявляет какой-либо специфичности к протеину.
2. В работе были использованы два типа альбуминов: сывороточный альбумин человека (САЧ) и бычий сывороточный альбумин (БСА), которые несколько различаются по первичной структуре (САЧ содержит один, а БСА- два остатка триптофана). Можно ли утверждать, что полученные данные с участием разных альбуминов не отличаются друг от друга, особенно при флуоресцентных исследованиях.
3. Кроме альбумина, известны ли другие белки, которые также взаимодействуют с указанными ДНК-специфическими лигандами, если да, то было бы уместным привести также такие данные в Лит. обзоре, или при обсуждении связывания указанных лигандов с альбумином.

В работе имеются некоторые технические недостатки, например, опечатки, некоторые неточности или смысловые повторы при анализе экспериментальных данных. Однако эти замечания не искажают общее, весьма положительное впечатление от работы. В целом диссертационная работа Н.Г. Петросян выполнена на высоком научном уровне и вносит значительный вклад в данную область исследований.

Опубликованные автором работы по теме диссертации хорошо отражают содержание диссертации. Содержания диссертации и автореферата полностью соответствуют.

Диссертационная работа Н.Г. Петросян по теме “Связывание ДНК-специфических лигандов метиленового синего и Hoechst 33258 с сывороточным альбумином”, полностью соответствует требованиям ВАК РА, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 –Биофизика.

Заведующая кафедрой молекулярной физики
Ереванского государственного университета,
доктор физико-математических наук, профессор

Е.Б. Далян

Подпись профессора Е.Б. Далян
Заверяю

Ученый секретарь Ереванского государственного
университета, кандидат филологических наук

11.11.2022



М.В. Оганесян