

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 и биоинформатика”.

Исследования по взаимодействию различных биологически активных соединений с макромолекулами (НК, белки) продолжают оставаться актуальными, несмотря на то, что эти системы являются объектом интенсивного исследования уже более сорока лет. При этом последовательное, скрупулезное и обоснованное изучение представителей различных семейств лигандов, таких как ДНК-специфические лиганды-интеркаляторы, желобковые соединения, а также протеин-специфические соединения, с привлечением широкого спектра теоретических, или экспериментальных моделей и методик, выделяется даже на фоне большого числа опубликованных работ в этой области.

К таким исследованиям относится диссертационная работа Н.Г. Петросян, посвященная взаимодействию ДНК-специфических лигандов метиленового синего и Hoechst 33258 с одним из наиболее важных белков – альбумином крови.

Она оформлена в классическом стиле, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 120 страницах текста, иллюстрирована 22 рисунками, 6 таблицами. Список цитируемой литературы состоит из 155 наименований.

Глава 1 посвящена обзору литературы, в которой подробно описаны структура и функции сывороточных альбуминов теплокровных, приведены данные по структурным изменениям белков, исследованиям инициации и изучения структурных изменений, и по взаимодействию некоторых низкомолекулярных веществ с протеинами. Достаточно объемно и

информативно изложены литературные данные, которые охватывают все основные аспекты механизмов указанных процессов. Ознакомление с этой главой оставляет благоприятное впечатление и выявляет хорошую осведомленность диссертанта в этой области.

Глава 2 посвящена материалам и методам исследования. В диссертационной работе использован ряд биофизических методов: УФ-денатурация, абсорбционная, дифференциальная, флуоресцентная спектроскопии, а также проведен термодинамический анализ систем альбумин-лиганд. Примененные методы являются высокоинформативными, и полученные данные не вызывают сомнений по точности и достоверности. К этой главе замечаний нет.

Третья глава посвящена экспериментальным исследованиям взаимодействия МС и Н33258 с альбумином. Проведен ряд сравнительных исследований по взаимодействию указанных лигандов с ДНК. Полученные данные выявили, что МС, связывающийся с ДНК несколькими способами, взаимодействует также с альбумином, однако не проявляет определенной специфичности к протеину. При этом предпочтительными для связывания МС становятся относительно гидрофильные участки (сайт II) альбумина, поскольку основную роль при связывании этого лиганда играет неспецифическое электростатическое взаимодействие.

Желобковосвязывающееся с ДНК соединение Hoechst 33258 также взаимодействует с альбумином. При этом, полученные данные указывают, что эти лиганды инициируют разнонаправленные конформационные перестройки в молекуле белка, что отражается на структурной стабильности макромолекулы: в случае Н33258 обнаруживается некоторое уменьшение упакованности (T_m комплексов уменьшается), в то время как в случае МС наоборот, имеет место увеличение степени упакованности (T_m комплексов возрастает) пространственной структуры белка.

МС и Н33258 с ДНК могут связываться как специфически (интеркаляционный механизм в случае МС, желобковое связывание в случае Н33258, который, при этом, проявляет выраженную специфичность к АТ парам ДНК), так и неспецифически (электростатический механизм). В случае альбумина определенный специфический механизм взаимодействия не обнаруживается, несмотря на то, что с белком эти лиганды могут связываться за счет гидрофобных, электростатических взаимодействий или водородных связей, которые в совокупности приводят к изменению фолдирования белка и к стабилизации его молекулы относительно температуры, как денатурирующего фактора.

Полученные данные выявляют, что МС локализуется во внутренней полости белка, вызывая конформационные перестройки, что приводит к дополнительному сворачиванию (folding) белка и ограничению мест связывания для этого лиганда. Н33258 же с альбумином образует водородные связи, а также связывается за счет ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. При этом выявлено, что связывание и Н33258, и МС с альбумином обуславливается энтальпийно-энтропийным компенсаторным механизмом, о чем свидетельствует отрицательное значение изменения свободной энергии Гиббса.

Проведенные исследования и полученные данные в диссертационной работе проливают свет на понимание возможных механизмов доставки различных лекарственных, а также биологически активных соединений к своим мишеням. Эти данные важны и с той точки зрения, что могут лечь в основу дизайна и скрининга новых лекарственных соединений, а также их тестирования на предмет связывания с альбумином, депонирования этим белком, и модуляцию их действия в *in vivo* системах.

К диссертанту имеются следующие вопросы:

1. Из работы тем не менее не ясно, чем обусловлено уменьшение флуоресценции, при связывании МС с альбумином, а в случае Н33258, уменьшение при определенных концентрациях белка, с последующим увеличением флуоресценции;
2. При связывании Н33258 с альбумином, на дифференциальных и флуоресцентных спектрах наблюдается гипсохромный эффект, который не обнаружен на аналогичных спектрах комплексов МС с альбумином.

В целом работа выполнена на достаточно высоком научном и экспериментальном уровне, примененные методы и полученные на их основании данные адекватны поставленным задачам и являются новой ступенью в подобных исследованиях, что вносит значительный вклад в данную область исследований.

Опубликованные автором публикации по теме диссертации хорошо отражают содержание диссертации. Автореферат полностью соответствует диссертационной работе.

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

Канд.биол.наук., доц.

Тирацуйан С.Г.

Подпись к.б.н, доц. Тирацуйан С.Г. заверяю.

Ученый секретарь РАУ



Касабабова Р.С.

01. 11.2022 г.