



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
(ИЭФБ РАН)**

пр. Тореза, д. 44, г. Санкт-Петербург, 194223
тел.: 552-79-01, факс: 552-30-12
e-mail: office@iephb.ru, http://www.iephb.ru
ОКПО 02698559, ОГРН 1027801535728
ИНН/КПП 7802038273/780201001

12.12.2022 № 1 / 890a

На №

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИЭФБ РАН
доктор биологических наук,
член-корр. РАН

М.Л. Фирсов

12. 2022 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертации
Гукасяна Геворга Вагановича «БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ
ФОСФОЛИПАЗ А2 И ДЕЗИНТЕГРИНОВ ЯДА ГАДЮК»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.00.02 – Биофизика, биоинформатика

**Актуальность темы диссертационной работы и ее связь с соответствующими
отраслями науки и практической деятельности.**

Лечебные свойства змеиных ядов и других зоотоксинов известны с давних времен, они проявляются при очень низких дозах, однако все еще многие существенные детали механизмов их терапевтического действия остаются неизвестными. Поскольку любой змеиный яд представляет собой совокупность ферментов и низкомолекулярных соединений, его действие во многом обусловлено взаимодополняющими (кооперативными) эффектами его компонентов. В частности, один из мажорных ферментов змеиного яда, фосфолипаза А2 (PLA2) представлена различными изоформами, существенно отличающимися между собой аминокислотным составом, трехмерной структурой и каталитическими свойствами, несмотря на то что все они катализируют гидролиз 2-ацильных групп фосфолипидов с образованием жирных кислот и лизофосфолипидов. Помимо PLA2, змеиные яды содержат дезинтегрины - пептиды, богатые цистеином, которые блокируют взаимодействие интегринов тромбоцитов и

других клеток с коллагеном матрикса и иными интегринами соседних клеток. Эти свойства дезинтегринов можно использовать для подавления агрегации тромбоцитов, ангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток. Экспериментальное исследование новых свойств PLA2 и дезинтегринов змеиного яда необходимо для дальнейшего расширения возможностей фармакотерапии, а значит является **своевременным и актуальным исследованием**, имеющим чрезвычайно важное социально-экономическое значение.

Цель диссертационной работы Гукасяна Г.В. состояла в комплексном исследовании структурно-функциональных особенностей наиболее активных компонентов яда закавказской гюрзы, сравнительный анализ с другими представителями данных классов веществ, оценка степени функциональной кооперативности компонентов яда и степени их взаимодействия с наночастицами, которые могут служить для направленного транспорта в организме человека. Среди поставленных задач - изучение конформационных изменений исследуемых белков или пептидов при их взаимодействии с наночастицами, изучение мембранотропного действия изоформ PLA2, оценка модуляции активности и вторичной структуры PLA2, определение кинетики взаимодействия различных дезинтегринов с интегринами, оценка антиадгезивные свойства дезинтегринов.

Научная новизна исследования и полученных результатов.

Автором диссертационного исследования впервые показано, что обтустатин и PLA2 в результате незначительных изменений вторичной структуры могут стать активными фармакологическими реагентами. Установлено, что структурное сходство и функциональный синергизм изоформ PLA2 позволяют использовать ее в качестве прототипа препарата комплексного действия в сочетании с наночастицами. На клеточных моделях показано, что компоненты яда кавказской гюрзы могут проявлять онкостатические свойства.

Структура и содержание работы.

Диссертация изложена на 119 страницах и состоит из введения, обзора литературы, методологической части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы (112 источников). Диссертация включает 5 таблиц и 36 рисунков.

Первая глава работы посвящена обзору литературы по проблеме исследования. Представлена структура и функции PLA2, описано суперсемейство фосфолипаз, их классификация и функции, затем описаны различные подсемейства PLA2, структура секреторных PLA2, фосфолипазы животных ядов и их неактивные

изоформы. В кратком, но емком обзоре наночастиц представлены катионные фосфоросодержащие дендримеры AE2G3, амфифильные фосфоросодержащие дендроны jq153, серебряные пэгилированные наночастицы BDAВ27. В подразделе «Интегрины и дезинтегрины» дана классификация и охарактеризованы функции интегринов, представлены типы дезинтегринов, особое внимание уделено обтустатину.

В разделе «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ» представлены перечни объектов и методов исследования, при этом описаны методы регистрации спектров флуоресценции и кинетики затухания микросекундной фосфоресценции, измерения дзета-потенциала, метод исследования вторичной структуры PLA2 при ее взаимодействии с наночастицами (круговой дихроизм), метод выделения фосфолипидов и формирования гигантских монослойных везикул, метод получения эритроцитарных теней и определение активности АТФаз, метод мембранных флуоресцентных зондов и расчет GP/3wGP величин, метод поверхностных акустических волн, определение активности фосфолипазы A2 и рамановская спектроскопия. Представлены методы статистической обработки экспериментальных данных.

В разделах с материалами собственных исследований автор сначала изложил результаты экспериментального исследования изменений конформации PLA2 гюрзы при ее взаимодействии с наночастицами методом флуоресценции. Затем изложены результаты сравнительного анализа конформации PLA2 гадюк и поджелудочной железы быка при взаимодействии с наночастицами методом флуоресценции, анализ дзета-потенциала PLA2 при ее взаимодействии с дезинтегрином обтустатином и наночастицами, результаты определения кинетики затухания и времени жизни фосфоресценции при комнатной температуре в микросекундном диапазоне PLA2. Представлены результаты исследования методом кругового дихроизма вторичной структуры PLA2 при ее взаимодействии с дезинтегрином обтустатином и наночастицами, результаты анализа рамановских спектров PLA2 из яда гюрзы, а также обтустатина. Описано исследование мембранотропного действия различных изоформ PLA2 из ядов гадюк на тени эритроцитов и липосом, исследование действия различных изоформ PLA2 из ядов гадюк на АТФазную активность эритроцитарных теней, кинетика связывания дезинтегринов с мембранами эритроцитов, полученная с помощью метода поверхностных акустических волн. Наконец, представлены результаты исследования антиадгезивных свойств дезинтегринов на различные клеточные системы.

На основании подробного описания результатов исследования изложено Заключение, которое по сути является обсуждением результатов, на основании которого сформулированы выводы.

Обоснованность используемых методов, а также полученных результатов и положений диссертации.

В диссертационном исследовании был использован широкий спектр биофизических, биохимических и физико-химических методов. Результаты, полученные в ходе исследования, обработаны с применением современных методов статистики, что дало возможность автору получить объективную и достоверную информацию, аргументированно и убедительно обосновать научные положения и выводы, которые в полной мере отражают основные результаты выполненного исследования, полностью соответствуют поставленным задачам.

Замечания и вопросы по диссертационной работе.

Замечаний принципиального характера по содержанию диссертационного исследования Г.В. Гукасяна нет. В то же время, в тексте есть опечатки и грамматические, стилистические и терминологические погрешности. Отметим те из них, которые связаны с профессиональной терминологией и вызывают замечания профессионального характера.

1) Неправомерно использовать словосочетания «активный сайт» и «ингибирующие свойства» применительно к дезинтегринам, они не являются ингибиторами в биохимическом понимании этого явления, тем более что автор в соответствующих разделах, характеризуя, например, обтустатин, справедливо называет его «блокатором» и приводит его функциональную характеристику IC_{50} , а не специфическую константу ингибирования K_i , вместо которой далее в этом разделе справедливо представлена константа диссоциации K_D , которая точнее характеризует тип межмолекулярного взаимодействия.

2) На рис.3-25 отсутствуют указания на статистически значимые отличия от контроля при явном наличии таких отличий. Непонятна надпись на оси У.

3) На рис.3-26 и 3-27 одинаково черные столбцы, причем два вместо трех, отражающие действие трех разных концентраций фосфолипазы А2. Кроме того, присутствует непонятный знак в подписи к рисункам.

4) На рис. 3-28 три столбца, что соответствует трем концентрациям, но опять же нет отличий между ними по цвету или даже оттенку. Легенда на рисунке никак не проясняет ситуацию.

Кроме того, при ознакомлении с диссертацией возникли вопросы.

1) В какой степени неферментативная активность изоферментов PLA2, которая «иногда играет более важную роль в развитии отравления, чем прямая липолитическая активность» (с.15), обусловлена физико-химическими или биофизическими аспектами их действия?

2) На с.84 сказано, что «электростатическое взаимодействие между катионным дендримером AE2G3 и PLA2 является довольно сильным». В связи с этим вопросы:

2А) можно ли количественно охарактеризовать силу электростатического взаимодействия?

2Б) какой вклад, по мнению автора, вносят другие типы нековалентного взаимодействия между дендримерами и PLA2 (ван-дер-ваальсово, гидрофобное, дипольное, водородные связи)?

2В) каково предположительное соотношение энтальпийной и энтропийной составляющих межмолекулярного взаимодействия?

3) В выводе 4 на с.89 утверждается, что «Выявлен синергический эффект различных изоферментов фосфолипазы A2 на бислой мембраны...». Вообще термин «синергизм» многократно употребляется в тексте диссертации. Вопрос: В отсутствие изоболограмм и связанного с их построением специфического исследования, что позволяет автору уверенно говорить именно об эффекте синергизма, а не о других видах кооперативного взаимодействия (аддитивность, потенцирование)?

Указанные замечания и недостатки не снижают общую положительную оценку диссертации, тогда как заданные вопросы могут послужить предметом для дискуссии или для дальнейших научных исследований диссертанта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Гукасяна Г.В. «БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ФОСФОЛИПАЗ A2 И ДЕЗИНТЕГРИНОВ ЯДА ГАДЮК», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – Биофизика, биоинформатика, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития биофизики. Диссертация представляет собой завершённое научное исследование, выполненное автором самостоятельно и на высоком уровне. Полученные автором результаты являются новыми, обоснованными и достоверными.

По актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных данных представленная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Гукасян Геворг Ваганович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – Биофизика, биоинформатика.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на заседании лаборатории сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), протокол №7 от 12 декабря 2022 г.

Главный научный сотрудник, зав. лабораторией сравнительной биохимии ферментов,

доктор биологических наук

 Н.В. Гончаров

Подпись д.б.н. Гончарова Н.В. заверяю

Ученый секретарь ИЭФБ РАН, к.б.н.

12 декабря 2022 г.



Е.И. Гальперина

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное название: Федеральное государственное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Сокращенное название: ИЭФБ РАН.

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, просп. Гореза, д.44.

Телефон: (812) 552-7901, факс: (812) 552-3012

e-mail: office@iephb.ru <http://http.www.iephb.ru/>