

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Лоншаковой-Мукиной Виктории Ивановны

«Закономерности функционирования бутирилхолинэстеразы и биолюминесцентной ферментной системы светящихся бактерий в гелеобразной среде крахмала и желатина», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность исследования. Диссертация Лоншаковой-Мукиной В.И. посвящена одному из актуальных направлений современных исследований в области биоанализа, связанному с изучением процессов инактивации ферментов, применяемых для определения биологически активных соединений – субстратов и эффекторов, а также поиском оптимальных путей стабилизации ферментных препаратов с целью их включения в состав портативных аналитических устройств. Ферменты достаточно давно зарекомендовали себя как элементы биораспознавания, однако их применение в реальных аналитических устройствах пока ограничено анализом глюкозы и ряда метаболитов. Не в последнюю очередь это связано с недостаточной устойчивостью ферментов, ограничивающих период эксплуатации соответствующих устройств. В случае определения эффекторов снижение активности фермента при хранении и проведении измерений может стать источником ложноположительных сигналов о присутствии токсикантов, что снижает достоверность анализа и его ценность для экологов, токсикологов, медиков и других специалистов. Включение в гели из биоразлагаемых материалов – один из наиболее перспективных подходов к решению проблем стабильности иммобилизованных ферментов, однако влияние высоковязких сред на стадии доставки субстратов ферментов и кинетику реакций фермент – субстрат и фермент – ингибитор не получили должного внимания в литературе. Вместе с тем, такие исследования могут составить теоретическую и практическую основу для расширения областей применения биосенсорных устройств, особенно ориентированных на использование вне специализированной лаборатории и неквалифицированными специалистами.

Вышесказанное определяет **актуальность** цели исследования, связанной с исследованием влияния гелевого окружения на функционирование двух ферментных систем – бутирилхолинэстеразы и биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза для их стабилизации и последующего применения в ингибиторном анализе.

Для достижения поставленной цели соискателем был сформулирован ряд задач, включающих оценку активационных параметров термической инактивации

#

ферментных систем в крахмальном и желатиновом микроокружении, кинетический анализ ингибирования ферментов в гелеобразных средах с участием модельных ингибиторов, поиск и обоснование оптимальных условий иммобилизации для обеспечения активности и стабильности препаратов при хранении с сохранением их чувствительности к ингибиторам, а также разработку новых способов тестирования водных проб на наличие ингибиторов бутирилхолинэстеразы.

Диссертация Лоншаковой-Мукиной В.И. изложена на 115 страницах текста компьютерной верстки. Работа состоит из введения, шести глав, выводов, заключения и списка литературы. Диссертация содержит 29 рисунков и 12 таблиц, в списке литературы 158 библиографических описаний работ отечественных и зарубежных авторов.

Во **Введении** обоснованы актуальность выбранной темы диссертации, цель и задачи исследования, приведены положения, составляющие научную новизну и практическую значимость работы, а также положения, выносимые на защиту. Оценена степень достоверности полученных результатов, приведены данные, связанные апробацией работы на конференциях различного уровня и в публикациях по результатам проведенных исследований. Отмечены личный вклад автора и соответствие диссертации паспорту научной специальности, а также кратко описана ее структура.

Глава 1 «Стабилизация ферментов в структуре природных биополимеров» содержит подробную характеристику использованных в работе ферментных систем с указанием их фермент-субстратной специфичности и особенностей строения. Также рассмотрены современные подходы к стабилизации ферментных препаратов для последующего применения в аналитических исследованиях. Помимо общей классификации методов, основное внимание уделяется стабилизации бутирилхолинэстеразы в крахмальном и желатиновом гелях, а также введению стабилизаторов с оценкой механизма их стабилизирующего действия на ферменты. Глава достаточно исчерпывающе характеризует современное состояние исследований в рамках объектов исследования диссертации и позволяет оценить достоинства и недостатки существующих подходов к стабилизации ферментов.

Глава 2 «Ферментативные методы анализа в экологическом контроле» посвящена применению ферментов для обобщенной оценки токсичности и определения индивидуальных токсикантов. В первом случае речь идет о тестах на основе ферментов светящихся бактерий, развитие которых в значительной степени опирается на достижения красноярской научной школы билюминесценции. В случае холинэстераз акценты смещены на способы оптической регистрации реакции

фермента с синтетическими субстратами. Характеристика определения индивидуальных соединений – ингибиторов бутирилхолинэстеразы сведена в удобную таблицу 2.1, содержащую данные о механизме ингибирования, оценки типа кинетики ингибирования и потенциальных областях применения.

Представленные в главах 1 и 2 данные обосновывают актуальность проведенного соискателем исследования и позволяют лучше понять логику исследования и оценить научную новизну и практическую значимость полученных результатов.

Глава 3 «Материалы и методы» содержит информацию об использованных реагентах и оборудовании, методиках получения иммобилизованных реагентов и исследования активности фермента. Подробность изложения, как и использование современных методов биохимических исследований, позволяют сделать заключение о **достоверности** полученных экспериментальных данных и выводов на их основе.

Собственные результаты, полученные Лоншаковой-Мухиной В. И., приведены в последующих главах 4-6.

Глава 4 «Кинетика температурной инактивации ферментов в гелеобразной среде» посвящена рассмотрению условий стабилизации активности ферментов при повышенных температурах. Первоначально были выбраны условия гелеобразования в присутствии желатина и крахмала, а далее для концентраций стабилизаторов, незначительно воздействующих на активность фермента, была исследована остаточная активность препаратов при повышенных температурах. К числу важных результатов следует отнести обнаружение излома на кинетических зависимостях температурной инактивации, объяснение которого для бутирилхолинэстеразы (диссоциативный механизм с разделением субъединиц фермента) получило подтверждение данными полунативного электрофореза. Количественная характеристика термической инактивации также включала определение активационных параметров в рамках теории активированного комплекса и энергии активации по уравнению Аррениуса. Наблюдаемые изменения параметров инактивации были связаны с особенностями гелеобразования желатина и крахмала. Аналогичные исследования были проведены с ферментами светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, где температуры инактивации оказались существенно ниже.

Глава 5 «Расчет кинетических констант Михаэлиса-Ментен функционирования бутирилхолинэстеразы в гелеподобных средах» посвящена анализу зависимостей скорости ферментативных реакций бутирилхолинэстеразы от концентрации субстрата и модельных ингибиторов в предположении

#

двухсубстратного процесса (присоединения двух молекул субстрата к активному центру фермента). Наиболее важным выводом этой части исследования является заключение о сохранении механизма ингибирования бутирилхолинэстеразы неостигмином и хлорофосом при введении в систему гелеобразователей (крахмала и желатина). По результатам исследования были установлены кинетические параметры реакций и сделан вывод о сохранении механизма ингибирования в присутствии стабилизаторов, важный с точки зрения практического применения полученных ферментных препаратов.

Глава 6 «Разработка стабильных многокомпонентных препаратов»

реализует установленные ранее закономерности функционирования ферментов в гелях для создания комплексных препаратов, максимально адаптированных для применения вне лаборатории. В случае бутирилхолинэстеразы такие препараты включали иммобилизованный в том же гелеобразователе реактив Элмана. При погружении в водный раствор бутирилтиохолина, синтетического аналога субстрата фермента, образуется окрашенный продукт с тиохолином, продуктом гидролиза. Кинетика его образования связана с параметрами реакции фермента и присутствием ингибиторов в анализируемой пробе. Модельными токсикантами выступили представители класса фосфорорганических соединений малатион и пиримифосметил. Установлена возможность определения препаратов на уровне их ПДК, а также сделаны рекомендации по выбору концентрации фермента для достижения указанной чувствительности. Для ферментов светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза сохранение активности достигалось путем внесения в состав препарата стабилизаторов – бычьего сывороточного альбумина, дитиотреитола и меркаптоэтанола. Количественно охарактеризована эффективность отдельных стабилизаторов по скорости снижения уровня люминесценции. Эффективность работы стабилизированных препаратов оценивали по относительному снижению уровня свечения в присутствии сульфата меди и бензохинона. Помимо них, были рассмотрены ряды структурно подобных модельных токсикантов, включающих хиноны, фенолы и некоторые соли тяжелых металлов. Они были классифицированы по характеру воздействия на интенсивность и продолжительность свечения. Для сравнения различных токсикантов, а priori имеющих разный механизм действия на ферменты, применяется классический для биотестирования подход, связанный с оценкой концентрации токсиканта, вызывающей 50% изменение сигнала, связанного с активностью фермента (IC_{50}). Полученные результаты могут в перспективе найти применение при планировании скрининга загрязнения различных объектов биоанализа.

#

Выводы и заключение обобщают основные результаты, полученные в работе, с указанием наиболее значимых возможных направлений дальнейшего развития указанной тематики исследования.

Характеризуя диссертацию Лоншаковой-Мукиной В.С. в целом, следует отметить, что это значительное многоплановое исследование, в котором на примере двух ферментных препаратов, различающихся по происхождению, механизму катализируемой реакции, разнообразию определяемых субстратов, изучены фундаментальные и прикладные аспекты их поведения при стабилизации в гелях и в присутствии дополнительных серосодержащих компонентов. Предложены биохимические механизмы реализации защитного действия гелеобразной среды и серосодержащих стабилизаторов, а также установлены термодинамические и кинетические параметры инактивации ферментных реакций с целью выбора оптимальных условий их применения для оценки ингибирующего действия токсикантов.

Работа обладает **научной новизной**. В ней впервые показан двухстадийный процесс термической инактивации бутирилхолинэстеразы лошади в гелеобразных средах, проведено сравнение термодинамической денатурации бутирилхолинэстеразы лошади и биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в отсутствие и присутствии высокомолекулярных соединений крахмала и желатина. Впервые изучена кинетика ингибирования бутирилхолинэстеразы лошади фосфорорганическими соединениями в гелях, и показано сохранение конкурентно-неконкурентного типа ингибирования, установленного для водных сред. Проведена оптимизация состава реагента на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза для повышения ее стабильности при сохранении чувствительности к ингибиторам.

Практическая значимость проведенного исследования определяется разработкой нового способа получения стабильных многокомпонентных препаратов на основе бутирилхолинэстеразы и упрощенного способа интегрального определения фосфорорганических пестицидов в водных средах.

Несмотря на общее положительное впечатление о работе, к ней имеются замечания, связанные с формой представления результатов.

1. Хотя использование ферментных препаратов, столь различных по происхождению, особенностям функционирования и механизму ингибирования, приветствуется и оправдано методологическим единством исследования, представление результатов по стабилизации и кинетики реакций

#

бутирилхолинэстеразы и биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза приводится достаточно независимо друг от друга. Хотелось бы видеть больше сравнения указанных систем и формулировки общих подходов к выбору условий получения стабилизированных препаратов и определения их активности в присутствии ингибиторов.

2. Наличие отрицательного энтропийного эффекта при температурной диссоциации ферментных препаратов и влияние на него особенностей структуры гелей – достаточно необычный результат, который требует более тщательного осмысления и более подробного обсуждения. Возможно, представляло интерес дополнительно изучить, какой механизм реализуется в каждом конкретном случае.
3. В случае выбора серосодержащих стабилизаторов необходимо определить, не могут ли они связывать ионы металлов, снижая тем самым их ингибирующее действие независимо от активности фермента в стабилизированном препарате. По крайней мере, дитиотреитол применяют для разрушения комплекса холинэстераз и ионов токсичных металлов с регенерацией активности фермента.
4. Выбор конкретных моделей токсикантов необходимо обосновывать, исходя из практики токсикологических исследований, механизма действия или области их практического применения (пестициды, ветеринарные препараты, компоненты промышленных стоков).
5. Содержательные главы 4-6 с собственными результатами автора содержат детали эксперимента, более уместные в главе 3 «Материалы и методы».
6. Работа хорошо вычитана, но содержит неточности в представлении данных. Так, не на всех графиках приведены стандартные отклонения экспериментальных точек, а там, где они есть, не указано число параллельных измерений и доверительная вероятность. В подписи к рис. 6.7 ошибочно указан хлорид хрома (II), тогда как речь должна идти о CrCl_3 .

Указанные замечания носят непринципиальный характер. Материалы диссертации прошли апробацию на многочисленных конференциях, опубликовано 10 статей в международных рецензируемых журналах, из которых две – в журналах Q1. Имеются два патента и 17 тезисов доклада. Ссылки на собственные работы автора в диссертации присутствуют. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Все экспериментальные результаты получены лично автором, некорректных заимствований и цитирования не установлено.

Все экспериментальные результаты получены лично автором, некорректных заимствований и цитирования не установлено.

Тема диссертации Лоншаковой-Мукиной В.И. «Закономерности функционирования бутирилхолинэстеразы и биолюминесцентной ферментной системы светящихся бактерий в гелеобразной среде крахмала и желатина» соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика (направления исследований 2. Молекулярная биофизика; 3. Физические принципы взаимодействия биологических систем с наноразмерными объектами).

На основании вышесказанного считаю, что диссертация Лоншаковой-Мукиной В.И. «Закономерности функционирования бутирилхолинэстеразы и биолюминесцентной ферментной системы светящихся бактерий в гелеобразной среде крахмала и желатина» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научных задач, имеющих значение для развития ферментативных методов анализа ингибиторов. По актуальности, объему выполненных исследований, новизне полученных результатов, теоретической важности и практическому значению она соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 01.10.2018 г. №1168, с изменениями и дополнениями от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Лоншакова-Мукина Виктория Ивановна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент,

Заведующий кафедрой аналитической химии

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

доктор химических наук (02.00.02 – Аналитическая химия), профессор

Евтюгин Геннадий Артурович

г. Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18

тел. 8 [REDACTED] 491,

e-mail: [REDACTED]@kpfu.ru

2 декабря 2022 г.

