

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Петрова Максима Николаевича на тему "ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ЭФФЕКТОРОВ НА КОНФОРМАЦИЮ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ЧЕЛОВЕКА" на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Важными задачами современной биохимии и энзимологии являются изучение свойств, структуры, функций биологических макромолекул, регулирующих процессы стабилизации кровяного давления, содержания вазоактивных пептидов в организме человека. А также поиск новых инструментов для создания биотехнологических методов практической медицинской диагностики патологических состояний организма на основе сравнительной характеристики макромолекул в норме и при развитии патологии. Ангиотензин-превращающий фермент – Zn^{2+} -зависимая пептидаза, состоящая из одной полипептидной цепи, которая содержит два домена (N- и C-домены), обладает широким спектром биологической активности. Фермент является одним из главных регуляторов кровяного давления, вместе с тем, он вовлечен в метаболизм нейропептидов, иммунную и репродуктивную функции, в развитие различных воспалительных процессов.

Диссертационная работа Петрова Максима Николаевича посвящена исследованию влияния экзогенных и эндогенных эффекторов на конформацию ангиотензин-превращающего фермента (АПФ). Актуальность такого исследования определяется неослабевающим интересом к изучению новых параметров связывания в активных центрах АПФ лигандов разной структуры, что приводит к различным изменениям конформации АПФ, которые могут являться базой, позволяющей разграничить два состояния норма/патология. В этом смысле они приобретают особый диагностический смысл. Исследование такого рода особенно важно в связи с тем, что ингибиторы АПФ являются первым средством при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Целью данной работы является проведение конформационного анализа АПФ на основе использования МАТ с применением разной структуры ингибиторов и модификаторов фермента, а также выполнение сравнительного

конформационного анализа АПФ в крови здоровых доноров и больных уреимией с целью выявления изменения конформации АПФ при развития патологии.

Научная новизна. Впервые, с помощью панели 17 моноклональных антител (мАт) изучено влияния ингибиторов АПФ лизиноприла и эналаприлата на конформацию АПФ. Полученные данные свидетельствуют, что связывание в активных центрах АПФ ингибиторов отличающихся по структуре приводит к различным изменениям конформации АПФ, что может служить основой наблюдаемых особенностей функционирования активных центров фермента при связывании лигандов различной структуры. Установлено, что разрыв дисульфидных мостиков в глобуле АПФ приводит к существенному изменению конформации фермента. При этом АПФ с восстановленными дисульфидными связями не претерпевает дальнейших изменений конформации под действием эналаприлата, а под действием тепротида изменяется конформация только С-домена в составе двухдоменного АПФ. Показано, что при гемолизе эритроцитов происходят изменения конформации фермента, схожие с изменениями конформации, вызванными действием глутатиона и дитиотреитола, приводящее к восстановлению дисульфидных связей.

Практическая значимость. Проведена практическая апробация панели специфических мАт. Обследованы больные уреимией (20 пациентов), в крови которых обнаружен конформационно измененный АПФ (20%). Изменения конформации затрагивают области связывания мАт 1В3 (на С-домене) и мАт 1G12 (на N-домене). Конформационно измененный АПФ характеризуется повышенной активностью по отношению к природному субстрату ангиотензину-I и пониженной чувствительностью к ингибирующему действию специфических ингибиторов – эналаприлата и тепротида. Показано, что в крови обследованных пациентов изменение конформации поверхности АПФ под действием ингибиторов (как эналаприлата, так и тепротида) менее выражено по сравнению с нормой, что позволяет рекомендовать им переходить на другой класс антигипертензивных средств.

Структура и объем работы. Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы (главы 1-3),

экспериментальной части (глава 4), описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения (главы 5-7), выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 8 таблиц и 46 рисунков, которые хорошо отражают большой объем проделанной автором работы. Список литературы включает 212 ссылок.

Обзор литературы включает рассмотрение всех основных аспектов, значимых при постановке задачи исследования и разработке плана действий по ее достижению, а также при оценке получаемых результатов. Обзор состоит из трех разделов. В первом кратко представлены данные о физиологической значимости ангиотензин-превращающего фермента. Рассмотрены структура, взаимное функционирование доменов фермента. На многочисленных примерах, в том числе взятых из работ последних лет, дан исчерпывающий обзор зависимостей *структура – активность*. Второй раздел обзора посвящен классу ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента. Поиск и исследование более совершенных природных и синтетических ингибиторов АПФ на данный момент является весьма актуальной задачей. В настоящий момент ингибиторы АПФ, наряду с такими известными препаратами, как диуретики, антагонисты кальция и др., являются наиболее эффективными средствами при лечении недостаточности кровообращения, остром инфаркте миокарда, больных с хроническим легочным сердцем. Уникальная ценность ингибиторов АПФ при лечении сердечно-сосудистых заболеваний обусловлена как улучшением качества жизни, так и снижением уровня смертности больных. Несмотря на то, что группа ингибиторов АПФ представлена широким спектром препаратов, наиболее важное значение для клинической практики сохраняют каптоприл, эналаприл и лизиноприл, как препараты наиболее изученные в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях. Завершает обзор раздел, в котором описаны возможные типы эффектов, вызываемых действием моноклональных антител. Дана общая характеристика антител и антигенов. Подробно описаны исследования структуры и функционирования ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител к N-домену и C-домену. Систематизированы результаты определения возможных видов его

каталитической активности. При этом собраны примеры соединений с необычной активностью для лигандов. Рассмотрены моноклональные антитела к различным эпитопам молекулы АПФ, которые влияют на функции фермента, а также проведено определение эпитопов связывания этих антител, которые дают уникальную возможность детально изучать структуру АПФ.

В целом раздел «Обзор литературы» отражает современный уровень научных разработок и обеспечивает возможность корректной интерпретации собственных данных автора. Детальность и качество изложения свидетельствуют о том, что диссертант хорошо владеет материалом по предмету исследования. Структура обзора четко продумана и соответствует тем проблемам, которые возникают при экспериментальной реализации диссертационной работы.

Экспериментальные результаты можно разделить на две логически связанные части. В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе реагенты и методики, нашедшие применение в исследовании. К наиболее важным относятся следующие. Выделение и очистка соматического ангиотензин-превращающего фермента и определение активности АПФ в присутствии ингибиторов; получение N-домена соматического ангиотензин-превращающего фермента, определение концентрации и чистоты выделенных препаратов фермента; подготовка пула плазмы крови; подбор оптимальных концентраций фермента и моноклональных антител для иммуносорбции, в том числе исследование влияния ингибиторов АПФ на связывание моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом; моделирование разрывов дисульфидных мостиков в N-домене ангиотензин-превращающего фермента. Выполнено измерение равновесных констант иммунохимической реакции, представлены данные для протоколов проведения и оптимизации иммунофлуоресцентного анализа, пробоподготовки биопроб, расчет аналитических характеристик разработанных систем определения. При этом автор показал владение основными биохимическими методами и приемами, включая различные виды хроматографии и иммуноанализа, электрофореза. Данный набор методов полностью соответствует задачам исследования и свидетельствует о высокой экспериментальной квалификации автора. Методики достаточно

подробно и четко изложены, что позволяет адекватно интерпретировать результаты работы.

Результаты и обсуждение.

В первой части этой главы автором представлены результаты определения влияния ингибиторов различной структуры на эффективность связывания моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом. В качестве С-домена АПФ использовали как природный фермент (тАПФ) из сперматозоидов (лизат), так и рекомбинантный. Установлено, что уникальная N-концевая последовательность (36 аминокислот) природного фермента не влияет на связывание исследуемых мАт. Этот факт определяет возможность использования тАПФ в эксперименте. Для работы выбран метод иммуносорбции благодаря его информативности и относительной простоте проведения анализа. Оценку связывания фермента с моноклональными антителами определяли по активности фермента. Большое внимание автором уделено подбору оптимальных условий иммуносорбции, где в качестве субстрата использовали Hip-His-Leu (HHL), дающий при гидролизе продукт His-Leu (HL), накопление которого определяли флюориметрически. На первом этапе определяли оптимальные условия (области линейного накопления продукта) реакции гидролиза субстрата и отсутствие тушения флуоресценции продуктом. Для определения предельно допустимой концентрации продукта реакции гидролиза субстрата строили градуировочную кривую. В результате с помощью панели из 17 мАт показано, что в присутствии ингибиторов изменяется связывание 5 мАт, специфичных к двум неперекрывающимся областям на поверхности N-домена и 4 мАт, специфичных к двум неперекрывающимся областям на поверхности С-домена АПФ.

Сопоставление данных по влиянию эналаприлата и тепротида на связывание панели мАт как с двудоменным АПФ, так и с отдельными N- и С-доменами АПФ выявило значительные различия между эффектом эналаприлата и тепротида. Наиболее наглядно эта разница наблюдается для мАт i2H5, 6A12 и 1G12 к N-домену (их эпитопы перекрываются) и мАт 3F11 к С-домену АПФ. Так, под действием эналаприлата эффективность связывания 4 мАт с АПФ повышается, а под действием тепротида, наоборот, понижается, что указывает на принципиально

различные структурные изменения при связывании ингибиторов разной структуры. Автором сделан вывод, что связывание ингибиторов в активных центрах АПФ изменяет эффективность связывания ряда мАт к N- и С-доменам фермента, то есть индуцирует конформационные изменения поверхности белковой глобулы. Ингибиторы разной структуры (аналоги трипептидов и нонапептид) могут вызывать разные конформационные изменения АПФ.

Полученные автором экспериментальные данные по сравнению зависимости эффективности связывания мАт 1G12 (к N-домену) и 3F11 (к С-домену) с АПФ от концентрации ингибитора с теоретическими кривыми моделирования степени связывания ингибиторов в активных центрах фермента показывают, что связывание тепротида на N-домене АПФ влечет за собой изменение конформации и соседнего С-домена.

Дальнейшие исследования с помощью мАт выявило новые факты и показало, что восстановление дисульфидных связей в глобуле АПФ глутатионом (GSH) и дитиотрептолом (DTT) приводит к изменению конформации АПФ схожей при гемолизе эритроцитов в биологических объектах. Компьютерное моделирование с использованием программных комплексов показало, что разрыв одного или нескольких дисульфидных мостиков в составе однодоменного фермента приводит к нарушению движения открывания-закрывания щели активного центра АПФ, что объясняет некоторое падение активности фермента под влиянием S-S восстанавливающих агентов.

Законченность и логичность работе придают исследования, описанные в четвертой части, посвященной тестированию 20 больных уремией. В крови 4 –х пациентов обнаружен АПФ с конформационно измененными областями связывания мАт 1B3 (на С-домене) и мАт 1G12 (на N-домене). Автором работы предложен метод фенотипирования АПФ индивидуальных пациентов, заключающийся в одновременном контроле соотношений 1G12/9B9 и ZPHL/ННL в плазме (сыворотке) крови. Разработанный подход позволяет выявлять пациентов, которые могут быть менее восприимчивы к терапии ингибиторами АПФ

Важно отметить, что настоящая диссертационная работа представляет собой один из примеров современного классического исследования в области биохимии и биотехнологии, включающего характерные стадии использования фундаментальных методов эксперимента, статистической обработкой полученных результатов и биологического тестирования на предмет изучения особенностей взаимодействия с молекулярными мишенями организма.

Знакомство с диссертацией Петрова М.Н. показывает, что автор досконально владеет техникой эксперимента и отличается высоким уровнем теоретической подготовки, позволяющей критически оценивать полученные результаты.

Диссертация написана хорошим литературным языком и логична в плане представления материала. Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечиваются применением современных методов исследования как биохимических, так и биотестирования.

Автореферат и опубликованные работы, среди которых 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, полностью отражают структуру, содержание, выводы и положения диссертации.

У оппонента нет серьезных замечаний ни по постановке эксперимента, ни по интерпретации результатов. При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые частные замечания.

- автором мало приведено указаний и предпосылок проведения исследований в области биотехнологии.
- наличие некоторых ошибок и опечаток в тексте.
- в работе присутствуют диаграммы, рисунки (таблицы), содержащие обширные массивы данных. Это затрудняет их анализ и снижает информативность.


Вышеизложенные замечания носят рекомендательный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и полученные результаты.

Проведенное диссертантом исследование выполнено на высоком уровне, с использованием комплекса современных методов. Не вызывает сомнения корректность планирования и выполнения экспериментальных работ, а также обсуждения установленных закономерностей. Полученные результаты имеют

научно-практическую значимость и формируют методическую основу для создания новых диагностических тест-систем.

Объем проделанной работы, актуальность, научная новизна и практическая значимость полученных результатов позволяют заключить, что диссертационная работа Петрова Максима Николаевича на тему "ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ЭФФЕКТОРОВ НА КОНФОРМАЦИЮ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ЧЕЛОВЕКА" полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Официальный оппонент:

Зав.лабораторией иммунохимии
Института физиологически активных веществ РАН,
заслуженный деятель науки РФ,
профессор, доктор биологических наук  М.А. Мягкова

Подпись профессора М.А. Мягковой заверяю:
Ученый секретарь ИФАВ РАН, к.х.н.



Т.Н. Великохатко

7 октября 2015 года

Сведения об официальном оппоненте диссертационной работы Петрова М.Н. на тему "ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ЭФФЕКТОРОВ НА КОНФОРМАЦИЮ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ЧЕЛОВЕКА" на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям
03.01.04 – биохимия
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Основное место работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности
Мягкова Марина Александровна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологических и активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН), Заведующая Лабораторией иммунохимии физиологических и активных веществ ИФАВ РАН.	доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ	03.00.04 Биохимия

Основные научные труды

Научные монографии

1. В.С. Морозова, О.А. Габрильянц, М.А. Мягкова. Диагностика и профилактика заболеваний зависимости: монография / М.: Издательский дом Академии Естествознания, 2015. – 178 с.
2. В.С. Морозова, М.А. Мягкова. Естественные антитела в диагностике заболеваний зависимости // М.: 2014, Издательский дом Академии Естествознания, – 170 с.

Список опубликованных статей

1. О.Ю. Польшваная, А.И. Левашова, В.С. Морозова, С.Н. Петроченко, М.А. Мягкова, И.А. Мосейкин. Уровни переносимости боли и факторы гуморального иммунитета при дорсалгии. Вестник РАМН. 2015; №1: 118-124.
2. Мягкова М.А., Морозова В.С., Петроченко С.Н., Артюшкова О.Ю., Манжос М.В., Хабибулина Л.Р. Иммунологические маркеры эффективности сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии. Сборник: «Новые информационные

технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. материалы Международной конференции: Весенняя сессия.» Под редакцией Е.Л. Глоризова. 2015. С. 19-28.

3. Морозова В.С., Другова Е.Д., Мягкова М.А. Определение шести классов психоактивных веществ в различных объектах методом иммунохроматографии. Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60. № 5. С. 27-31.
4. А. И. Левашова, В. С. Морозова, О. Ю. Польшьяная, С. Н. Петроченко, Н.Ю. Келина, М. А. Мягкова, И. А. Мосейкин. Сравнительный анализ интенсивности болевого синдрома и иммунохимических показателей – уровней естественных антител у больных хронической дорсалгией. - Биологические Мембраны, 2014 том 31, №3, с.1-8
5. Мягкова М.А., Морозова В.С. - Иммунохимические свойства естественных антител к физиологически активным соединениям. - Фундаментальные исследования, 2014 №11 (часть 5), с. 1066-1070(обзор).
6. Мягкова М.А., Морозова В.С. - Естественных антитела и их физиологические функции.- Иммунопатология. Аллергология. Инфектология., 2014, №3, с.75-81(обзор).
7. Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Морозова В.С., Мосейкин И.А., Шипицын В.В., Польшьяная О.Ю. Антитела к эндогенным биорегуляторам и их связь с возрастными и гендерными особенностями хронического болевого синдрома // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова, 2013, №4, с.41-44.
8. Морозова В.С., Польшьяная О.Ю., Петроченко С.Н., Шипицын В.В., Мягкова М.А., Мосейкин И.А. Определение естественных антител к эндогенным биорегуляторам у людей с острой и хронической болью методом иммуноферментного анализа и их связь с гендерными особенностями. // Земский врач, 2013, №2, с. 39-43.
9. Келина Н.Ю., Мамелина Т.Ю., Романова Л.Н., Петроченко С.Н., Мягкова М.А. Определение естественных антител к эндогенным биорегуляторам в технологиях оценки риска у больных с кардиологической патологией // Технологии живых систем, том 9 №2, 2012 г. С. 61-66.
10. М.В. Манжос, К.В. Блащенко, Е.С. Феденко, Г.А. Керопян, М.А. Мягкова Актуальные вопросы сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии в практике врача-аллерголога. // Аллергология и иммунология в педиатрии, №2 (29), 2012 г., с. 21-27.
11. Солодухина Н.М., Злыднева Л.А., Левшенко Е.Н., Мягкова М.А., Грицкова И.А. Полистирольные микросферы как носители биолиганда при определении Δ^9 -тетрагидроканнабинола в моче человека // Биотехнология, 2012, №1, С. 90-96.
12. Мягкова М.А., Морозова В.С., Петроченко С.Н., Левашова А.И., Мосейкин И.А., Шипицын В.В., Сокольчик Е.И., Брюн Е.А. Сравнительный анализ гуморальных факторов иммунитета у пациентов с хроническим болевым синдромом. // Сборник статей Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», г. Пущино, Московской обл., 24-26 мая 2011 г. Том 2, с. 534-539.
13. R. Yu. Kiselyova, M. A. Myagkova, I. V. Shakir, E. A. Bryun, and V. S. Morozova. Development of Enzyme Immunoassay of Amphetamines in Human Biological Fluids. Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, Vol. 47, No. 7, pp. 707–710.
14. Брюн Е.А., Мягкова М.А., Морозова В.С., Морозов С.В. Сравнительный опыт определения наркотических веществ в России и за рубежом. (обзор) // Вопросы наркологии. – 2011. – №1 – с. 7-14 .
15. Мягкова М.А., Морозова В.С., Петроченко С.Н., Левашова А.И., Мосейкин И.А., Шипицын В.В., Сокольчик Е.И., Брюн Е.А. Сравнительный анализ гуморальных факторов иммунитета у пациентов с хроническим болевым

синдромом. // Сборник статей Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», г. Пущино, Московской обл., 24-26 мая 2011 г. Том 2, с. 534-539.

Официальный оппонент:

Зав.лабораторией иммунохимии
Института физиологически активных веществ РАН,
заслуженный деятель науки РФ,
профессор, доктор биологических наук

М.А. Мягкова

Подпись профессора М.А. Мягковой заверяю
Ученый секретарь ИФАВ РАН Т.Н. Великохатко



Т.Н. Великохатко

7 октября 2015 года

Адрес - 142432, Московская область, Ногинский район,
г. Черноголовка, Северный проезд, дом 1. Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ
Российской академии наук (ИФАВ РАН),
тел/ факс 8 (496) 52- 49-508
m.a.myagkova@gmail.com