

119121, гор. Москва, ул. Погодинская, 10, стр.8

тел.: (+7/499) 246-69-80, (+7/499) 246-34-66, факс: (+7/499) 245-08-57, эл. почта: inst@ibmc.msk.ru, http://www.ibmc.msk.ru
ОКПО 01897373, ОГРН 1027739053792, ИНН/КПП 7704084419 / 770401001, ОКАТО 45286590000

№ 587

«08» октября 2015 г.



А.В. Лисица

«08» октября 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей научной организации – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» на диссертационную работу Петрова Максима Николаевича «Влияние экзогенных и эндогенных эффекторов на конформацию ангиотензин-превращающего фермента человека», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Оценка актуальности темы диссертационной работы.

Ангиотензин превращающий фермент (АПФ) (КФ 3.4.15.1) – ключевой фермент ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем, участвует в метаболизме вазоактивных пептидов, а именно, в образовании прессорного пептида ангиотензинаII и разрушении депрессорного пептида брадикинина. Помимо регуляции артериального давления и гомеостаза АПФ вовлечен в обмен нейропептидов, репродуктивные процессы, защитные и иммунные реакции организма. В настоящее время обнаружены новые природные субстраты АПФ, что открывает потенциальную роль фермента в целом ряде физиологических и патологических процессов. АПФ способен расщеплять гемопозитический пептид N-Ас-SDKP-ОН (горалатид), являющийся отрицательным регулятором пролиферации стволовых клеток, люлиберин, лютейнизирующий и гонадотропин-высвобождающий гормоны, пептид бета-амилоид, накапливающийся в мозге при болезни Альцгеймера.

Молекула соматического АПФ (сАПФ) представляет собой полипептидную цепь, содержащую два высокомолекулярных, каталитически активных домена (N- и С- домены).

Каждый домен имеет активный центр, включающий атом цинка. В настоящее время известны структуры отдельных N- и C-доменов сАПФ, однако структура двудоменного фермента неизвестна, имеются лишь модели, описывающие вероятное взаимное расположение доменов в составе сАПФ. Показано, что при взаимодействии с лигандами различной длины (субстратами и ингибиторами) активные центры сАПФ могут функционировать либо независимо друг от друга, либо оказывать негативное влияние на функционирование друг друга, что предполагает взаимодействие доменов в составе сАПФ.

Ингибиторы АПФ (иАПФ) широко применяются в качестве антигипертензивных и органо-протекторных препаратов как при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, так и при диабете, атеросклерозе, нефропатии. Самыми часто назначаемыми иАПФ являются короткие синтетические аналоги пептидов – каптоприл, лизиноприл, эналаприлат. В настоящее время с помощью моноклональных антител (мАт) к АПФ установлено, что взаимодействие этих ингибиторов с активными центрами АПФ изменяет некоторые участки поверхности молекулы. Использование мАт дает возможность также выявлять конформационно измененный АПФ, продуцируемый различными тканями организма, в том числе при ряде патологий. Предполагается, что конформационные изменения АПФ могут влиять на функционирование его доменов.

Представленные данные однозначно свидетельствуют об актуальности изложенного в диссертационной работе М.Н. Петрова исследования влияния эндогенных и экзогенных эффекторов на конформацию АПФ человека, в том числе при уремии, с использованием мАт, которые являются чувствительным и точным инструментом для тестирования конформационных изменений белков.

Новизна и практическая значимость исследований.

В диссертационной работе впервые продемонстрированы данные, которые свидетельствуют о том, что при связывании ингибиторов в активных центрах АПФ подавляющая часть поверхности двудоменной молекулы фермента претерпевает конформационные изменения, которые зависят от структуры ингибиторов. Изменения такого рода могут обуславливать различия в функционировании активных центров доменов при связывании лигандов различной структуры.

Основным подходом, с помощью которого автор тестировал изменение конформации АПФ под действием ингибиторов, явилось использование панели мАт, связывающихся с

различными участками поверхности N- и C- доменов АПФ. В работе были использованы иАПФ – аналоги трипептидов (лизиноприл,эналаприлат) и девятичленный ингибитор тепротид, а также панель из 17 мАт – 9 к N-домену и 8 к C-домену, связывающимися с разными участками поверхности АПФ. В диссертационной работе впервые было продемонстрировано, что влияние тепротида на конформацию АПФ принципиально отличается от влияния эналаприлата и лизиноприла. На основе сравнительного анализа экспериментальных и теоретических данных было установлено, что взаимодействие тепротида с одним из доменов АПФ приводит к изменению конформации также второго домена фермента.

Одним из важнейших направлений представленного исследования является изучение влияния химической модификации молекулы АПФ, приводящей к разрыву дисульфидных мостиков (имеющиеся в обоих доменах АПФ), на топографию ее поверхности. Показано, что глутатион (GSH), уровень которого в крови значительно повышен у пациентов при уремии и у пациентов на гемодиализе, восстанавливая дисульфидные связи в молекуле АПФ, приводит к значительному изменению конформации фермента.

Несомненный практический интерес представляет исследование АПФ в крови пациентов больных уремией, которое показало, что в 20% случаев в крови больных присутствует конформационно измененный АПФ, характеризующийся повышенной активностью по отношению к природному субстрату ангиотензину-I и пониженной чувствительностью к действию ингибиторов – эналаприлата и тепротида. Автором разработан новый метод фенотипирования АПФ индивидуальных пациентов, который позволяет выявлять пациентов, потенциально менее восприимчивых к терапии ингибиторами АПФ. Рассмотрение полученных данных в контексте практического приложения может служить рекомендацией перехода на другой класс антигипертензивных препаратов.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 142 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы (главы 1-3), экспериментальную часть, описывающую материалы и методы, результаты и их обсуждение (главы 4-8), выводы, содержит 8 таблиц, 46 рисунков и список цитируемой литературы из 212 источников. Обзор литературы непосредственно связан с темой исследования; материал хорошо структурирован и четко изложен. В нем суммированы сведения о физиологической роли и структурных особенностях АПФ, его специфических ингибиторах, а также о структурно-

функциональном анализе различных форм АПФ с помощью мАт. М.Н. Петров подробно рассматривает структуру соматического АПФ и его доменов, анализирует данные о взаимном функционировании каталитических центров доменов в составе АПФ. Большой интерес представляют приведенные автором данные о структурных особенностях ингибиторов, применяемых в клинической практике в качестве антигипертензивных препаратов, а также о домен-селективных ингибиторах АПФ и двойных вазопептидазных ингибиторах, являющихся основой создания более эффективных лекарственных средств. Особое внимание М.Н. Петров уделяет исследованиям, касающимся функционирования АПФ и его доменов, выполненных с использованием мАт, которые в настоящее время широко используются в фундаментальных исследованиях для идентификации белков и дифференциации различных типов клеток. В целом, обзор литературы отражает современное состояние исследований по теме диссертации и служит хорошим введением к изложению автором собственных результатов.

Раздел «Экспериментальная часть» включает использованные в рамках проведенного исследования материалы и методы, касающиеся выделения и очистки различных форм АПФ и его доменов, тестирование их чистоты, концентрации и активности. Для определения констант связывания мАт с АПФ и изучения влияния на этот процесс ингибиторов и модификаторов АПФ автором был использован иммуносорбционный анализ. Подтверждение достоверности полученных результатов получено при их статистической обработке. Компьютерное моделирование было использовано для анализа изменений структуры белка при разрыве дисульфидных связей. Исследования, проведенные на образцах крови здоровых доноров и больных уремией, были выполнены при совместной работе с одним из ведущих медицинских учреждений – Московским государственным медико-стоматологическим университетом. Использованные автором методы полностью соответствуют поставленным задачам и отражают современный уровень проведения молекулярно-биологических, биохимических и биотехнологических исследований.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает четыре главы. В первой главе исследована эффективность связывания панели мАт с АПФ человека из крови и семенной жидкости. По мнению автора, обнаруженные отличия в относительном связывании мАт могут быть обусловлены разницей в гликозилировании ферментов, а также наличием в составе биологических жидкостей соединений, влияющих на связывание мАт с АПФ.

Вторая глава раздела посвящена определению влияния ингибиторов эналаприлата (лизиноприла) и тепротиды на эффективность связывания мАт с АПФ. Показано, что для значительной части мАт эффективность их связывания с АПФ изменяется при

взаимодействии ингибиторов с активными центрами фермента, что свидетельствует о конформационных изменениях поверхности АПФ. Для анализа взаимного влияния доменов при связывании ингибиторов в активных центрах соматического АПФ были сопоставлены данные наблюдаемых изменений эффективности связывания мАт с АПФ при его взаимодействии с трипептидными и нонапептидным ингибиторами с теоретическими кривыми, характеризующими насыщенность активных центров АПФ молекулами ингибитора. Показано, по крайней мере для тепротида (нонапептидного ингибитора, обладающего специфичностью к С-домену, при связывании которого с сАПФ явление отрицательной кооперативности отсутствует), что взаимодействие ингибитора с активным центром любого из доменов сАПФ приводит к изменению конформации не только этого, но и соседнего домена.

В третьей главе раздела анализируется влияние агентов, восстанавливающих дисульфидные связи в молекуле белков – глутатиона, присутствующего в крови пациентов при уремии, и дитиотреитола – на эффективность связывания мАт с АПФ из крови человека, а также на дальнейшие конформационные изменения АПФ под действием ингибиторов. Обнаружено, что восстановление дисульфидных связей в молекуле АПФ меняет его конформацию таким образом, что она уже не изменяется под действием эналаприлата, однако тепротид все же способен изменять конформацию С-домена. Применение метода компьютерного моделирования позволило установить, что разрыв дисульфидных мостиков в составе однодоменного фермента приводит к нарушению движения открывания-закрывания щели активного центра, что объясняет падение активности фермента под влиянием агентов, восстанавливающих дисульфидные связи.

Четвертая глава раздела посвящена иммунохимической характеристике АПФ при уремии, основанной на сравнительном анализе АПФ в образцах крови, взятых у пациентов с уремией и здоровых доноров. Исследование включает тестирование активности АПФ с использованием синтетических трипептидных субстратов и определение эффективности связывания всей панели мАт с АПФ. В работе учитывались следующие показатели: ZPHL/HNL – соотношение скоростей гидролиза субстратов Cbz-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu и 1G12/9B9 – соотношение эффективностей связывания двух мАт к N-домену АПФ, при этом одновременное повышение обоих соотношений свидетельствует о присутствии в крови экзогенных ингибиторов, применяемых в качестве лекарств. Показано, что повышение значения 1G12/9B9 при нормальном значении ZPHL/HNL указывает на наличие в крови пациента конформационно измененного АПФ. Важно, что активность подобного измененного АПФ значительно слабее тормозится эналаприлатом и тепротидом. Эти данные послужили для выработки автором нового

научного подхода, который может использоваться в клинической практике для выявления пациентов, мало восприимчивых к терапии ингибиторами АПФ для перевода их на альтернативные группы антигипертензивных препаратов.

Выводы, представленные в диссертационной работе М.Н.Петрова, полностью соответствуют полученным результатам, являются **достоверными и обоснованными**. Диссертантом выполнен значительный объем экспериментальной работы с привлечением самых современных методов биохимии, биотехнологии и компьютерного моделирования. Полученные результаты не вызывают сомнений. Они представлены на шести российских и международных симпозиумах, конференциях и конгрессах. Основные положения и выводы диссертационной работы отражены в 8 публикациях, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Содержание автореферата полностью отражает результаты и основные выводы проведенной диссертационной работы.

Замечаний по выполненной работе мало. Диссертационная работа логично выстроена, хорошо написана и тщательно оформлена, хотя и не лишена некоторых стилистических погрешностей и синтаксических ошибок. Существенное замечание следующее: известно, что величины констант диссоциации комплексов мАт-АПФ того же порядка, что и величины констант ингибирования фермента специфическими ингибиторами, поэтому возможность отмывки ингибиторов из активных центров АПФ при сохранении комплексов мАт-АПФ в процессе проведения иммуноферментного анализа стоило обсудить более подробно.

Пожелания по дальнейшему использованию полученных автором результатов. Предложенный автором подход, позволяющий выявлять конформационно измененный АПФ, может быть использован: 1) для тестирования конформации АПФ при ряде других заболеваний, сопровождающихся повышенным синтезом АПФ, например, при болезни Альцгеймера или опухолевой прогрессии, когда повышение активности АПФ рассматривается в качестве неблагоприятного прогностического признака; 2) для сравнительного анализа результатов экспериментов, проведенных в системах *in vitro* и *in vivo*, касающихся обнаружения и тестирования АПФ, в ходе которых обнаруживаются расхождения в данных об интенсивности расщепления ферментом природных и синтетических субстратов и/или торможения его специфическими ингибиторами.

Результаты исследований М.Н. Петрова, выносимые на защиту, были представлены в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» и обсуждены на межлабораторном семинаре с участием лаборатории биохимии и

химической патологии белков, лаборатории биосинтеза белков и лаборатории клеточной биологии 29 сентября 2015 г. (протокол № 6).

Диссертационная работа М.Н. Петрова «Влияние экзогенных и эндогенных эффекторов на конформацию ангиотензин-превращающего фермента человека», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), является законченным научным исследованием, отвечающим в полной мере по своей значимости, новизне и актуальности всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, в редакции от 30.07. 2014г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и химической патологии белков
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»
кандидат биологических наук

Е.В. Кугаевская

« 6 » октября 2015 г.

Подпись

Ученый секретарь ИБМХ и.и.н. Карлова Е.А.



Почтовый адрес: Москва, 119121, ул. Погодина дом10, стр 8.

Телефон: (499)246-50-72.

Адрес электронной почты: Elena.Kugaevskaya@ibmc.msk.ru

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертационной работе Петрова Максима Николаевича
«Влияние экзогенных и эндогенных эффекторов на конформацию ангиотензин-превращающего фермента человека», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Полное и сокращенное название ведущей организации	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», ИБМХ
Почтовый адрес	Москва, 119121, ул. Погодинская, дом 10, стр. 8.
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	http://www.ibmc.msk.ru
Телефон	(499)246-69-80
Адрес электронной почты	inst@ibmc.msk.ru
Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание руководителя ведущей организации и лица, утвердившего отзыв ведущей организации	Лисица Андрей Валерьевич, ВРИО директора ИБМХ, доктор биологических наук, член-корр. РАН
Фамилия, имя, отчество, лица, составившего отзыв ведущей организации, ученая степень, отрасль науки, научные специальности, по которым им защищена диссертация, ученое звание, должность и полное наименование организации, являющейся местом его работы.	Кугаевская Елена Владимировна, кандидат биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии и химической патологии белков Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации за последние 5 лет (не более 15 публикаций).	Кугаевская Е.В., Елисеева Ю.Е. Ингибиторы АПФ – активаторы рецепторов кининов. Биомедицинская химия 2011, том 51, вып.3, стр 282-299. Козин С.А., Мезенцев Ю.В., Кугаевская Е.В., Цветков Ф.О., Иванов А.С., Арчаков А.И., Макаров А.А. Использование эналаприлата для ингибирования цинк-зависимой димеризации бета-амилоида при лечении болезни Альцгеймера. Патент на изобретение № 2530601 от 05 октября 2012 г. Кугаевская Е.В.. Ангиотензин превращающий

фермент и болезнь Альцгеймера.
Биомедицинская химия 2013, том 59, вып.1, стр.
5 - 24.

Соловьева Н.И., Тимошенко О.С., Кугаевская
Е.В., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э.
Ключевые ферменты деструкции и ангиогенеза,
как факторы прогрессии опухоли при
плоскоклеточной карциноме шейки матки.
Биоорганическая химия, 2014, 40(6):743-751.

Е.В. Кугаевская, О.С. Тимошенко, Н.И.
Соловьева. Ангиотензин превращающий фермент:
антигенные свойства доменов, роль в
метаболизме пептида бета-амилоида и
опухолевой прогрессии. Биомедицинская химия
2015, том 61, № 3, стр 301-311.

Тимошенко О.С., Кугаевская Е.В., Гуреева Т.А.,
Завалишина Л.Э., Андреева Ю., Франк Г.А.,
Соловьева Н.И. Матриксные
металлопротеиназы 2 и 9, их эндогенные
регуляторы и ангиотензин превращающий
фермент при плоскоклеточной карциноме
шейки матки, Архив патологии, 2015, т.77, №5,
стр. 31-35.

Ученый секретарь ИБМХ
Канд. хим. наук



Карпова Е.А.