

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Шнитко Алексея Валерьевича на тему «Влияние плуроников L121, P123 и F127 на коллоидно-химические, структурные и ферментативные свойства лизоцима», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.14. – «Радиохимия» и 03.01.04 – «Биохимия по химическим наукам».

В современном научном мире в качестве одной из наиболее актуальных задач признана разработка материалов для адресной доставки лекарственных препаратов, под которой понимают транспорт молекул лекарственного соединения в целевую область организма, органа, биологической ткани или клетки при помощи определённого носителя, обладающего заданными свойствами. В качестве носителя могут выступать экзогенные молекулы и/или наночастицы. Наибольшее распространение в качестве систем доставки получили липосомы и мицеллы, наиболее широкое применение получившие при лечении онкологии. Ещё больший интерес представляют соединения, которые могут выступать одновременно в качестве носителей для адресной доставки лекарственных препаратов, так и в качестве модификаторов биологического ответа, т.е. соединений, способных изменять или усиливать естественные процессы, протекающие в организме.

Одними из таких соединений являются блок-сополимеры полиэтиленоксида(ПЭО) и полипропиленоксида (ППО), известные как плуроники. Мицеллы на основе плуроников, содержащие лекарственные препараты, были одними из первых полимерных мицелл, прошедших успешные испытания в экспериментах с животными и людьми. Последующие работы показали на примере плуроников наличие у сополимеров этиленоксида и пропиленоксидасвойств модификаторов биологического ответа. Предложенный механизм взаимодействия плуроников с биологическими клетками включает взаимодействие с белками клетки на поверхности клеточных мембран и в объёме внутренней среды клетки. Однако данные литературы о характере взаимодействия плуроников с белками остаются неполными. Под вопросом стоит возможность плуроников образовывать устойчивые комплексы с белками посредством нековалентных взаимодействий и влиять на их структуру и свойства. Благодаря важности плуроников, взаимодействие их с белками — предмет многих исследований. Существует множество методов изучения белок-полимерных взаимодействий. Каждый из подходов имеет свои сильные и слабые стороны. Применение новых методов исследования белок-полимерных взаимодействий может привести к получению новых фундаментальных данных, необходимых для дальнейшего применения плуроников в экспериментальной медицине.

В связи с этим, диссертационная работа Шнитко Алексея Валерьевича, **целью** которой являлось определение влияния плуроников L121, P123 и F127 на коллоидно-химические, структурные и ферментативные свойства глобулярного белка лизоцима куриного яйца, представляется своевременной и актуальной. Дополнительную ценность данной работе придаёт использование в качестве основного инструмента радиохимического метода— метода тритиевого зонда, основанного на использовании реакций атомарного трития и меченных тритием соединений. Описанный в работе подход несомненно является новым и перспективным и в будущем может найти широкое применение в биохимических исследованиях.

Научная новизна состоит в том, что предложен относительно новый подход для определения количества белков и плуроников на границе раздела фаз, а именно, определение адсорбции и коэффициента распределения меченного тритием белка (или плуроника) в присутствии второго компонента (который не содержит тритиевую метку) в двухфазной системе вода/органическая жидкость, в которой в качестве органической жидкости используется жидкий органический сцинтиллятор, преобразующий энергию ионизирующего излучения в световые вспышки (метод жидкостной сцинтилляционной спектроскопии (ЖСС)). Разработанный подход позволил получить количественные оценки поведения белков на границе раздела фаз в присутствии плуроников. Полученные данные по адсорбции и распределению белков и плуроников были использованы для объяснения характера их взаимодействия и для расчёта параметров межмолекулярного взаимодействия в модели Файнермана. На основе полученных данных выдвинуты предположения об образовании за счёт водородных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий устойчивых комплексов лизоцим-плуроник с отличающимися адсорбционными свойствами.

Практическая значимость заключается в том, что описанный подход может стать основой расширенного применения радиохимических методов при проведении физико-химических и биохимических исследований, а выявленные закономерности взаимодействия глобулярных белков и плуроников на границах водный раствор/органическая жидкость и водный раствор/воздух, а также влияние плуроников на структуру и каталитические свойства белков расширяют наше представление о функционировании комплексов на основе плуроников в живых организмах, на основании чего можно сделать вывод о том, что полученные данные могут быть применены при разработке лекарственных препаратов на основе плуроников.

Структура диссертации построена по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы (часть 1), описание материалов и методов исследования (часть 2),

изложение результатов исследования и их обсуждение (часть 3), выводы и список литературы. Работа изложена на 173 страницах, содержит 10 таблиц и 36 рисунков, которые весьма хорошо отражают объём проделанной работы. Список литературы включает 409 источников.

В обзоре литературы автор рассматривает основные аспекты, значимые при постановке задач исследования, разработке плана исследования, анализе и обсуждении полученных результатов. Обзор состоит из двух частей. Первая часть (глава 1.1.) посвящена взаимодействию плуроников с белками. В главе 1.1.1. описаны структура и номенклатура плуроников. Глава 1.1.2. включает описание физико-химических свойств плуроников и их мицелл и влияния условий окружающей среды, низко- и высокомолекулярных соединений на процесс мицеллообразования. Глава 1.1.3. посвящена поведению плуроников на границе раздела фаз, способности плуроников принимать различные конформации при адсорбции на границе раздела, вытеснению белков плурониками с границы раздела. В главах 1.1.4. и 1.1.5. приведено описание взаимодействия с белками плуроников как неионогенных ПАВ, особенностей и отличий от взаимодействия с белками ионогенных ПАВ. Глава 1.1.6. посвящена влиянию плуроников на структуру и ферментативные свойства белков. Данные о влиянии плуроников на белки остаются неполными, и глава рассматривает в основном влияние полиэтиленгликоля и некоторых блочных амфифильных соединений на его основе, на многочисленных примерах давая исчерпывающий обзор по этой теме. Приведены основные факторы, влияющие на белки: молекулярный краудинг и неспецифическое взаимодействие, которым посвящены главы 1.1.7 и 1.1.8, соответственно. В главе 1.1.9. даётся дополнительная информация о лизоциме, как выбранном объекте исследования.

Вторая часть (глава 1.2.) демонстрирует радиохимический подход к изучению взаимодействия плуроников и белков. Глава 1.2.1. включает описание радиоактивных изотопов, которые используются при изучении белков и ПАВ (иода-125, фосфора-32 и -33, серы-35, углерода-14, трития), их преимуществ и недостатков, а также обоснование использования трития в качестве радиоактивной метки. Глава 1.2.2. посвящена основным методам получения меченных тритием соединений (прямой химический синтез, биохимические методы, изотопный обмен), в т.ч. используемому в данной работе методу термической активации трития (МТАТ). В главе 1.2.3. рассматриваются особенности взаимодействия атомарного трития с органическими соединениями. Главы 1.2.4. и 1.2.5. посвящены методам исследования белков и других высокомолекулярных соединений, основанным на использовании меченных тритием соединений – методу жидкостной сцинтилляционной спектроскопии в варианте сцинтиллирующей фазы и методу

третичной планиграфии, соответственно, а также полученным с их помощью данным о поведении белков и ионогенных ПАВ на границе раздела фаз.

В целом обзор литературы отражает современный уровень научных исследований и обеспечивает возможность корректной интерпретации полученных автором исследований. Детальность и качество изложения говорят о том, что автор хорошо владеет материалом по теме исследования. Структура чётко продумана: первая часть соответствует тем проблемам, которые возникают при исследовании белков и плуроников; вторая часть — их решению с помощью радиохимических методов.

Экспериментальная часть (глава 2) содержит описание материалов и методик, использованных в данной работе. Объектами исследования в данной работе были выбраны плуроники L121, P123 и F127, полиоксиэтиленлауриновый эфир Бридж-35, глобулярный белок лизоцим куриного яйца, относящийся к ферментам класса гидролаз. Основным методом, который используется в работе, является радионуклидный метод исследования системы белок-плуроник, включающий: получение с помощью МТАТ меченных тритием лизоцима (индивидуального и в смеси с плурониками), плуроника P123, Бридж-35; очистку и выделение меченых соединений; анализ распределения трития в аминокислотных остатках лизоцима в отсутствие и присутствии НПАВ; определение состава адсорбционного слоя лизоцим-НПАВ на межфазной границе водный раствор/*n*-ксиллол и водный раствор/воздух. Кроме описанного радионуклидного метода в работе были использованы гелпроникающая хроматография (ГПХ), с помощью которой были определены основные характеристики плуроников; измерение поверхностного натяжения на границе раздела жидкость/жидкость с помощью метод висящей капли; различные методы молекулярной спектроскопии (УФ-спектрометрия, флуоресцентный анализ, спектроскопию кругового дихроизма (КД), спектроскопия малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS)); определение каталитических характеристик лизоцима в присутствии плуроников и Бридж-35 по турбидиметрическому методу; моделирование комплексов лизоцима с плурониками и адсорбционного слоя (молекулярный докинг). Перечисленные методы и приёмы соответствуют заявленным специальностям и полностью отвечают цели и задачам исследования, свидетельствуя о высокой экспериментальной квалификации автора. Методики достаточно подробно и ясно изложены, помогая анализировать и интерпретировать полученные результаты.

Наибольший интерес представляют **результаты и их обсуждение**, изложенные в главе 3. В первой части этой главы автором представлены основные физико-химические характеристики исследуемых плуроников. Анализ плуроников с помощью ГПХ показал, что используемые в работе плуроники соответствуют заявленным характеристикам. С

помощью метода висящей капли были получены значения критической концентрации мицеллообразования (ККМ) плуроников в используемой в работе буферной системе. Полученные значения ККМ были в дальнейшем использованы автором при подборе оптимальных условий экспериментов. Полученные значения согласуются с данными литературы. В следующей главе автор приводит радиохимические характеристики полученных меченных тритием лизоцима, Бридж-35 и плуроника P123: радиохимический выход меченых соединений и удельную радиоактивность. Чистота полученных меченых соединений была подтверждена с помощью хроматографического анализа.

Чтобы учесть эффект от хлорид-ионов на адсорбцию и распределение белка в системе водный раствор/органическая жидкость, были проведены дополнительные эксперименты: приведена зависимость адсорбции лизоцима на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол от концентрации хлорида натрия; показано, что добавление хлорид-ионов к 0,01 М фосфатному буферу не влияет на распределение лизоцима в двухфазной системе, но уменьшает адсорбцию на границе раздела фаз в два раза. С помощью полученных значений поверхностного натяжения были определены константа диффузии k_d и константа проникновения k_p . Показано, что лизоцим в физиологическом растворе диффундирует и проникает в адсорбционный слой в два раза быстрее, чем в растворе, содержащем только фосфат-ионы. Интересно, что замена хлорид-иона на бромид- и фторид-ионы приводила к увеличению коэффициента распределения в системе водный раствор/*n*-ксилол, а адсорбция на межфазной границе практически не менялась.

Следующая глава посвящена изучению взаимного влияния лизоцима и НП АВ при конкурентной адсорбции на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор воздух с помощью методов ЖСС и тензиометрии. Диссертантом показано, что присутствие НП АВ вызывает увеличение коэффициента распределения белка, на основании чего автор делает вывод о наличии изменений в структуре белка или образовании комплексов, что в дальнейшем автором неоднократно подтверждено. Автор выдвинул предположение, что в исследуемой системе происходит образование комплексов лизоцим-плуроник, которые, с одной стороны, упрощают проникновение лизоцима в органическую фазу, а с другой – препятствуют адсорбции белка на границе раздела фаз за счёт стерического отталкивания, возникающего между цепями ПЭО комплекса белок-лизоцим и цепями ПЭО плуроника, адсорбированного на границе раздела фаз. Использование различных буферных систем показало отсутствие влияния ионной силы на наблюдаемый эффект, на основании чего автор сделал вывод о том, что ключевую роль во взаимодействии плуроников и белков играют водородные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Полученные с помощью метода ЖСС значения состава

адсорбционного слоя были использованы для определения параметров межмолекулярного взаимодействия между белком и НПАВ в поверхностном слое. Была использована модель, предложенная Файнерманом и его соавторами, в которое входит шесть неизвестных параметров, в т.ч. три параметра межмолекулярного взаимодействия. Автор предложил способ решения этого уравнения и показал, что полученные значения параметров межмолекулярного взаимодействия могут быть в дальнейшем использованы для описания конкурентной адсорбции белков и плуроников также и на границе водный раствор/воздух.

Интересно, что, согласно полученным данным, плуроник P123 и Бридж-35, имеющие одинаковые по длине цепи ПЭО, несмотря на различия в строении и молекулярной массе гидрофобного фрагмента оказывают одинаковое влияние на вытеснение белка с границы раздела фаз, что позволило автору выдвинуть предположение о ключевой роли цепей ПЭО во взаимодействии плуроников и белков. Логичным продолжением исследования было определение влияния длины цепи ПЭО на взаимодействие плуроников с белком. Для этого диссертант рассматривал влияние плуроников F127, P123 и L121 на адсорбцию лизоцима на межфазных границах водный раствор/*n*-кислород и водный раствор/воздух. С помощью метода ЖСС автором исследования было показано, что с увеличением длины цепи ПЭО плуроник сильнее вытесняет лизоцим с границы раздела. Для всех плуроников было показано, что их присутствие вызывает уменьшение адсорбции лизоцима на межфазной границе независимо от ионной силы раствора или присутствия различных анионов, что подтверждает предположение о связывании белка за счёт водородных или ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

Далее автор рассматривает структуру комплексов лизоцима с плурониками, анализируя распределение трития в аминокислотных остатках белка. Полученные значения удельной радиоактивности аминокислотных остатков белка позволили автору сделать вывод о пространственной ориентации лизоцима. Показано, что в присутствии плуроников радиоактивность аминокислотных остатков и белка в целом может как уменьшаться, так и увеличиваться, что на первый взгляд противоречит данным о вытеснении плурониками белка с границы раздела фаз. Диссертант сумел выйти из этого кажущегося противоречия и дать ему логическое объяснение, показав умение сопоставлять полученные результаты с данными литературы.

На следующем этапе работы автор провёл анализ конформационных изменений в белке, происходящих в результате образования комплексом с плуроником. Было обнаружено изменение пространственного окружения остатков ароматических

аминокислот, в первую очередь — триптофана, участвующего в связывании фермента с пептидогликаном клеточных стенок бактерий, что было затем подтверждено в экспериментах по изучению ферментативной активности лизоцима в присутствии плуроника. Данные эксперименты показали, что инкубация в течение 48 часов в присутствии плуроников приводит к уменьшению ферментативной активности лизоцима и изменению его каталитических свойств. Диссертант открыл, что присутствие плуроника P123 вызывает отклонение гидролиза *Micrococcus luteus* лизоцимом от кинетики Михаэлиса–Ментен, и предложил модель, объясняющую наблюдаемое отклонение.

Следует подчеркнуть, что выводы диссертационной работы аргументированы и логичны, они полностью соответствуют полученным результатам. Обоснованность выводов подтверждена апробацией основных положений и выводов на российских и международных научных конференциях.

Диссертационная работа Шнитко Алексея Валерьевича, безусловно, заслуживает самой высокой оценки. Тем не менее, по материалам диссертации можно сделать некоторые замечания.

- 1) Автор не объясняет выбор границы водный раствор/*n*-ксилол в качестве модели границы раздела фаз.
- 2) Результаты, касающиеся влияния галогенид-ионов на распределение лизоцима в системе водный раствора/*n*-ксилол и его адсорбцию на границе жидкость-жидкость (параграф 3.3) никак не используются при обсуждении результатов.
- 3) В тексте диссертации присутствуют стилистические ошибки и неточности.

Сделанные замечания не снижают ценности работы, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и полученные результаты, и не отменяют положительной оценки.

Приведённое диссертантом исследование выполнено на высоком уровне, с использованием широкого комплекса современных методов и с учётом всех имеющихся в литературе данных.

Диссертация отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.14. – «Радиохимия» и 03.01.04 – «Биохимия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пунктами 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а сам автор заслуживает

присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.14. – «Радиохимия» и 03.01.04 – «Биохимия по химическим наукам».

Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук,

Ведущий научный сотрудник

Института биофизики СО РАН –

обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН

Кудряшева Надежда Степановна

«11» ноября 2020 г

Контактные данные:

Тел. +7-913-561-33-15,

E-mail: n-qdr@yandex.ru.....

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация
03.00.02 – Биофизика.

Адрес места работы:

660036 Красноярск Академгородок 50/50.

Институт биофизики СО РАН

Тел.: +7-3912-494242. e-mail: kudr@ibp.ru

Подпись Н.С.Кудряшевой заверяю: