

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор -
проректор по научной работе
РУДН, д.м.н., профессор,
член-корреспондент РАН
А.А. Костин



_____ 2025 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации - Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» о значимости диссертационной работы Королёвой Полины Игоревны на тему «Электрохимические цитохром р450-системы для повышения эффективности каталитических процессов и анализа межлекарственных взаимодействий», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Актуальность диссертационной темы

Диссертационная работа Королёвой Полины Игоревны на тему «Электрохимические цитохром Р450-системы для повышения эффективности каталитических процессов и анализа межлекарственных взаимодействий» посвящена актуальной проблеме биохимии и энзимологии – изучению каталитических свойств цитохромов Р450 с помощью создания биосенсоров на основе их изоферментов. Цитохромы Р450 – важнейшее семейство ферментов, одной из функций которых является участие в первой фазе биотрансформации ксенобиотиков. Кроме того, некоторые изоферменты цитохрома Р450 являются регуляторами метаболических путей, в том числе биосинтеза холестерина и стероидных гормонов, что делает их мишенями при разработке лекарственных препаратов. Исследования в этой области

необходимы для предсказания возможных межлекарственных взаимодействий и предотвращения побочных эффектов при полипрагмазии. Электрохимические методы представляют собой актуальный инструмент для исследования каталитических свойств цитохромов P450.

Научная новизна работы

В диссертации предложен и успешно применен новый подход к изучению взаимодействия цитохрома P450 с субстратом – оценка потенциала начала катализа, который позволяет оценить порядок взаимодействия субстратов с цитохромом P450. Разработана модельная электрохимическая система на основе иммобилизованного цитохрома P450 3A4 для исследования взаимодействия лекарственных средств, при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, вызванных инфицированием *Helicobacter pylori*. Автором был разработан ряд новых подходов к иммобилизации цитохромов P450, позволяющих существенно увеличить эффективность цитохром P450-зависимого электрокаталитического процесса. В диссертационной работе впервые использованы нековалентные иммобилизованные на поверхности рабочей рабочего электрода комплексы цитохрома P450 3A4 и P450 2C9 с флавиновыми кофакторами в качестве низкомолекулярных моделей НАДФН-зависимой цитохром P450 редуктазы для увеличения выхода биоэлектрохимической реакции. Впервые предложена схема модификации электрода, использующая нанопоровые структуры, образованные мембранным порообразующим белком стрептолизином O или пространственно-упорядоченными наноструктурами на основе анодного оксида алюминия, для встраивания цитохрома P450 3A4 в матрицу модификатора, позволившая увеличить эффективность электрокатализа более чем в два раза.

Научная и практическая значимость

К настоящему времени известны несколько десятков лекарственных препаратов, которые подвергаются действию различных изоферментов цитохромов с целью их выведения из организма в дальнейшем.

Значительный список лекарств оказывает ингибирующее действие на цитохромы, влияя на их функциональность, что в большом количестве случаев приводит к развитию побочных эффектов в организме. Поэтому создание в представленной работе электрохимических систем на основе цитохромов P450 имеет как научную, так и практическую значимость, и находит свое применение для исследования фармакокинетики лекарственных веществ. Кроме того, биосенсоры на основе цитохромов P450 могут использоваться для изучения субстратных и ингибиторных свойств лекарств, моделирования межлекарственных взаимодействий, а также для детекции токсических соединений в различных средах. Потенциальное практическое применение могут найти биокатализаторы на основе цитохромов P450.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Полученные в ходе выполнения работы результаты верифицированы должным образом согласно современным научным представлениям. Определенные в работе каталитические константы реакций согласуются с данными, представленными в научных статьях, в том числе полученные другими методами. Обсуждение результатов проведено с учетом новейших достижений в области биологических и медицинских наук. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены экспериментальными данными.

Полнота освещения положений и результатов диссертации в публикациях

Изложенные в диссертации научные положения и результаты были освещены в 27 публикациях автора, включая 15 статей в рецензируемых научных журналах и 12 работ в сборниках тезисов. В публикациях подробно отражены результаты, полученные в работе и описаны методики, применявшиеся в работе.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Королёвой Полины Игоревны имеет классическую структуру и удовлетворяет требованиям к научным исследованиям. Работа состоит из следующих последовательно представленных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы.

Во введении изложена актуальность и проблематика темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, обоснованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Автор подчеркивает необходимость создания электрохимических систем для изучения ферментов цитохромов P450.

Глава 1. посвящена обзору литературы по проблематике исследования, ее условно можно поделить на три подраздела. В первом подразделе приводятся современные научные данные, характеризующие ферменты цитохромы P450. Второй подраздел освещает проблематику межлекарственных взаимодействий, механизмы их возникновения и методы исследования межлекарственных взаимодействий, происходящих под действием цитохромов P450 в системах *in vivo*, *in vitro* и *in silico*. В третьем подразделе описана перспектива создания биореакторов на основе цитохромов P450, как ферментов, обладающих уникальными каталитическими свойствами; также приведены ограничения, присущие биореакторам на основе цитохромов P450, и способы их решения. В первой главе проводится подробный анализ проблематики исследования каталитической активности цитохромов P450. Обзор литературы написан последовательно, широко охватывает и анализирует современную литературу по теме и является теоретической основой для последующего исследования.

Глава 2. описывает материалы, инструменты и методы, использованные в работе. Автор подробно описывает способы модификации

печатных графитовых электродов и последующую иммобилизацию препарата фермента.

Глава 3. посвящена полученным результатам и их обсуждению и составляет основную часть диссертации. Автор делит данную главу на два подраздела, первый из них посвящен созданию эффективных цитохром Р450 систем для исследования межлекарственных взаимодействий. Вторым подразделом автор посвятил описанию разработанных систем на основе цитохромов Р450, позволивших значительно увеличить эффективность катализа.

В заключении автор подводит итоги работы и говорит об актуальности исследований в данной области науки. Выводы обобщают все полученные в ходе работы результаты и соответствуют поставленным задачам.

Список использованной литературы включает в себя 187 работ, в том числе новейшие публикации.

Кроме того, диссертационная работа включает в себя такие разделы, как список использованных сокращений и приложения.

Вопросы к диссертационной работе

Нет ли другого способа определять концентрацию цитохромов, кроме определения оптической плотности в указанном диапазоне?

Перед началом работы ферментные электроды инкубировали 10 минут в буфере. За это время цитохромы Р450 могли перейти в раствор, или они прочно удерживаются на электроде? Насколько стабильно связаны цитохромы Р450 с электродом?

Являются ли использованные изоформы цитохрома Р450 стабильными и насколько устойчивы эти белки к инактивации при иммобилизации?

Существует ли зависимость между количеством иммобилизованного цитохрома Р450 и током восстановления?

Коррелирует ли максимальный каталитический ток, полученный в экспериментах хроноамперометрического титрования с количеством полученного продукта?

Обычно образование фермент-субстратного комплекса происходит очень быстро. Для иммобилизованных ферментов существует проблема диффузии субстрата к ферменту. Не связано ли увеличение V_{max} в случае предварительной инкубации иммобилизованного фермента в присутствии субстрата с насыщением белковой пленки на поверхности электрода субстратом?

Замечания к диссертационной работе

В работе иногда встречаются неточности, например, название п. 1.4. Обзора литературы: «Причины возникновения межлекарственных взаимодействий, метаболизируемых цитохромами P450». Возможно, использованные в работе методы лучше описаны в опубликованных работах. В диссертации было бы целесообразно описать эксперименты более внимательно.

На рисунках 8 и 10 представлена зависимость каталитического тока ПГЭ/ДДАБ/СУРЗА4, от концентрации омепразола, регистрируемая амперометрическим методом при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В и аналогичная зависимость в присутствии эритромицина. Возможно, несмотря на большую разницу значений по оси ОУ, стоило бы объединить эти графики или расположить их рядом. Если сигмоидный характер кривой на рис.8 визуально заметен, и это демонстрируется данными расчета коэффициента Хилла, то на рис.10 он практически не виден и слабо подтверждается ($n = 1,2$, что приближено к 1,0).

Выводы диссертационной работы перегружены цифровыми характеристиками, установленными в ходе исследования.

Представленные выше вопросы и замечания не умаляют значимости проведенного исследования.

Заключение

Таким образом, диссертация Королёвой Полины Игоревны «Электрохимические цитохром P450-системы для повышения эффективности каталитических процессов и анализа межлекарственных

взаимодействий», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия, является научно-квалификационной работой, имеющей важное научное значение и полностью соответствует пункту 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Королёва Полина Игоревна достоин присуждения искомой степени по специальности 1.5.4. - Биохимия.

Настоящий отзыв подготовлен профессором кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», доктором биологических наук Лукашевой Еленой Васильевной, обсужден на заседании кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», протокол № 8-1-2025 от 28.03.2025.

Профессор кафедры биохимии им. академика
Т.Т.Березова медицинского института РУДН,
доктор биологических наук

Лукашева Елена
Васильевна



Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Тел. (495) 787-38-03, (495) 434-42-12, (495) 434-66-82

e-mail: rector@rudn.ru; rudn@rudn.ru