

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кузикова Алексея Владимировича на тему «Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450: идентификация метаболитов и кинетический анализ», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы диссертационного исследования

Одно из ведущих мест в изучении энзимологии суперсемейства цитохрома P450 занимают электрохимические методы. Электрохимические системы удобны для практического использования при решении задач фармакологии, связанных с определением активности цитохромов P450. К настоящему времени разработано большое количество электрохимических систем для определения активности иммобилизованных на электроде цитохромов P450 как рекомбинантных, так и мембраносвязанных, достигнуты успехи в разработке способов химической модификации электродов для иммобилизации цитохромов P450 при сохранении их каталитической активности. Однако остаются проблемы в производительности электрохимических систем и удобстве практического применения при идентификации и количественном определении метаболитов P450-зависимых каталитических реакций. Разработка высокопроизводительных и удобных способов идентификации и количественного определения метаболитов цитохром P450-зависимых реакций, основанных на применении электрохимических методов, является современной **актуальной** задачей энзимологии P450 и экспериментальной фармакологии. Диссертационная работа Кузикова Алексея Владимировича посвящена этой актуальной теме – развитию новых методологических подходов для идентификации и количественного определения продуктов цитохром P450-зависимых реакций, необходимых для решения различных биомедицинских задач

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В диссертационной работе Кузикова Алексея Владимировича предложены и развиты новые методологические подходы для идентификации и количественного определения продуктов цитохром Р450-зависимых реакций - электрохимической идентификации и флуоресцентной спектроскопии после химической дериватизации.

Для определения активности цитохромов Р450 (СYP19A1, СYP2C9, СYP2C19, СYP2E1) разработана оригинальная электрохимическая система, основанная на различиях электрохимических свойств субстратов этих ферментов и продуктов метаболизма субстратов.

Для определения активности СYP3A4 разработан оригинальный подход, при котором фермент иммобилизован на электроде, а образующийся метаболит определяется методом флуоресцентной спектроскопии после химической дериватизации.

Такие новые методологические подходы позволили автору получить ряд принципиально новых результатов, связанных с определением кинетических параметров цитохром Р450-зависимых реакций, которые определяют их практическое значение для фармакологических исследований при скрининге и изучении свойств ингибиторов цитохромов Р450, для поиска новых лекарственных соединений и оценки межлекарственных взаимодействий, обусловленных ингибированием индивидуальных изоферментов цитохромов Р450.

Общая характеристика работы. Оценка структуры и содержания работы

В целом диссертационная работа представляет собой солидное фундаментальное исследование. Диссертация написана хорошим научным стилем с логической последовательностью изложения материала. Диссертация изложена на 274 страницах машинописного текста, включает 84 рисунка и 8 таблиц. Состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), материалов и методов (Глава 2), результатов и их обсуждения (Глава 3), заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 377 источников, и приложения.

Во «Введении» описано современное состояние исследований в той области науки, в которой работает автор, перечислены проблемы, заслуживающие дальнейшего изучения, поставлены цели и задачи конкретного исследования,

представленного в диссертационной работе, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту. Также излагается научная новизна, теоретическая и практическая значимость, ценность работы, личный вклад автора, а также сведения об апробации результатов.

Глава «Обзор литературы» представляет собой насыщенный информацией раздел диссертационного исследования и не оставляет сомнения в компетентности автора.

В этой главе анализируются известные достижения и теоретические положения, существующие в современной литературе по вопросам как общих представлений о значении цитохромов P450 и особенностях их структурной и функциональной организации, так и электрохимических методах и системах в исследованиях суперсемейства цитохрома P450.

Затем автор подробно и критически анализирует методологию определения активности цитохромов P450, проводит достаточно глубокий обзор электрохимических систем на основе цитохромов P450 и теоретические аспекты функционирования электрохимических систем на основе цитохромов P450, а также электрохимические системы на основе очищенных цитохромов P450. Большая часть в обзоре отводится рассмотрению таких аспектов, как адсорбция цитохромов P450 на немодифицированных электродах, иммобилизация на электродах с помощью тонких и полимерных пленок, инкапсулирование цитохромов P450 с помощью гелей, иммобилизация цитохромов P450 на поверхности электродов ковалентная и с помощью композитных материалов. Описаны электрохимические системы на основе полусинтетических флавоцитохромов P450 и химерных цитохромов P450, а также на основе мембраносвязанных цитохромов P450.

Автор анализирует также концепцию биэлектродных электрохимических систем для определения активности ферментов, возможностей электрохимического определения метаболитов лекарственных соединений, продуктов реакций ароматического гидроксирования и О-деалкилирования.

В заключении к обзору подробно обосновывается актуальность разработки подходов к идентификации и количественного определения метаболитов цитохром Р450-зависимых реакций, основанных на применении электрохимических методов.

Все положения главы «Обзор литературы» подкреплены ссылками на оригинальные работы отечественных и зарубежных авторов.

Глава «Материал и методы» написана подробно, с указанием всех необходимых деталей использованных подходов:

- для химической модификации электродов и иммобилизация цитохромов Р450, цитохрома b5, НАДФН-Р450 редуктазы или бактосом,
- для исследования электрохимических свойств цитохромов Р450, цитохрома b5, НАДФН-Р450 редуктазы и бактосом в анаэробных условиях,
- для электрохимического определения субстратов и метаболитов цитохром Р450-зависимых реакций, для определения электрокаталитической активности цитохромов Р450 (CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1),
- для электрокаталитической активности CYP3A4 по отношению к гидрокортизону, для определения гидрокортизона и 6β-гидроксикортизола методом флуоресцентной спектроскопии, а также
- для определения параметров стационарной кинетики биотрансформации исследуемых соединений при участии цитохромов Р450.

Приведены также сведения о математической и статистической обработке данных.

Глава «Результаты и их обсуждение».

Специфика выполненной работы делает не только возможным, но и необходимым обсуждать результаты одновременно с их описанием.

В главе 3.1 представлены результаты исследования, выполненного для обоснования методологии биэлектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов Р450, в которой один из электродов служит для иммобилизации рекомбинантных или мембраносвязанных цитохромов Р450 и

донором электронов для восстановления иона железа гема, а второй – для идентификации и количественного определения образующихся продуктов путем их электрохимического окисления.

Для этого, прежде всего, исследованы электрохимические свойства ряда метаболитов лекарственных или эндогенных соединений, образующихся при участии клинически значимых цитохромов P450 - CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1.

Представлены результаты исследования электрохимических свойств андростендиона и тестостерона, являющихся субстратами CYP19A1, (*S*)-варфарина, диклофенака и (*S*)-напроксена - субстратов CYP2C9, фенитоина – субстрата CYP2C19, и хлорзоксазона - субстрата CYP2E1.

Представлены также результаты исследования электрохимических свойств продуктов метаболизма этих субстратов - эстрона, β -эстрадиола, (*S*)-7-гидроксиварфарина, 4-гидроксидиклофенака, (*S*)-О-десметилнапроксена, гидроксифенитоина и 6-гидрокси-хлорзоксазона.

Полученные результаты показали, что электрохимическое окисление указанных субстратов происходит при потенциалах, отличных от потенциалов электрохимического окисления соответствующих продуктов.

С использованием описанной биэлектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов P450 были определены кинетические профили реакций ароматизации андростендиона и тестостерона, кинетические профили реакций гидроксилирования (*S*)-варфарина, диклофенака, фенитоина и хлорзоксазона.

Установлен также механизм переноса электронов между электродом и компонентами бактосом и показана стимулирующая роль цитохром P450 редуктазы на электрокаталитическую активность CYP2E1 в составе бактосом.

И, наконец, была исследована возможность использования биэлектродной электрохимической системы определения активности цитохромов P450 для изучения ингибирования CYP19A1, CYP2C9 и CYP2C19 экземастаном, сульфафеназолом и флуконазолом, соответственно. Результаты дали положительный ответ.

В главе 3.2 представлены результаты исследования, выполненного для обоснования подхода для определения метаболитов электрокаталитических цитохром Р450-зависимых реакций, основанных на флуоресцентной спектроскопии.

Представлены результаты определения активности СYP3A4 по отношению к специфическому субстрату гидрокортизону, при котором фермент иммобилизован на электроде, а образующийся метаболит, 6 β -гидроксикортизол, определяется методом флуоресцентной спектроскопии после химической дериватизации. Показано, что 6 β -гидроксикортизол, являющийся продуктом СYP3A4-зависимого гидроксилирования гидрокортизона, после обработки смесью серной кислоты и этанола имеет характеристический пик флуоресценции.

С использованием описанной системы для определения гидроксилазной активности иммобилизованного на электроде СYP3A4 по отношению к гидрокортизону был определен кинетический профиль реакции.

Была также исследована возможность использования описанной системы определения активности электрокаталитической СYP3A4-зависимой реакции, основанной на флуоресцентной спектроскопии продукта реакции, для изучения ингибирующих свойств кетоконазола. Результаты показали, что такой подход может использоваться для выявления ингибиторов данного фермента.

Описанные результаты проиллюстрированы многочисленными графиками и таблицами, результаты наглядно иллюстрированы и таблицами.

Произведено сравнение собственных результатов с мировыми литературными данными. Обсуждение полученных результатов позволило соискателю удачно обобщить результаты проведенной работы.

В «Заключении» подробно и аргументированно подводятся основные итоги проделанной работы и на основе полученного материала и его анализе корректно формулируются Выводы, которые полностью отражают суть проведенного исследования экспериментального и соответствуют поставленным цели и задачам диссертационного исследования, а также положениям, выносимым на защиту.

Автореферат в полной мере отражает основные результаты диссертации.

Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений, результатов и выводов

Диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом, методическом и экспериментальном уровнях. Электрохимические исследования, абсорбционная спектроскопия выполнялась на современных приборах, снабженных специализированным программным обеспечением. Полученные результаты обработаны общепринятыми методами статистического анализа с применением компьютерных программ и имели хорошую воспроизводимость, что подтверждает достоверность полученных результатов.

По результатам диссертационной работы соискателем в соавторстве опубликованы 29 работ, в том числе 21 научная статья в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК. и 8 работ в сборниках трудов научных конференций. Результаты диссертации доложены и обсуждены на научных мероприятиях международного, всероссийского и регионального уровней. Опубликованные работы отражают основные результаты диссертации.

Замечания и вопросы

В целом диссертационная работа не вызывает вопросов и замечаний по форме, способу изложения и содержанию, поскольку исследование выполнено на высоком методическом уровне, хорошо продуман дизайн работы, несомненно получены новые научные данные.

Замечание вызывает лишь оформление подписей к рисункам, которые затрудняет понимание представленного материала. По существу, нет названия у рисунков 18-20, 27-29, 31, 33, 35, 36, 39, 44, 45, 47, 50, 51, 53, 56, 57, 59. Текст под этими рисунками начинается со слов «Квадратно-волновые вольтамперограммы, зарегистрированные с помощью ПГЭ в 100 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ ...». И только по обозначениям в этих рисунках, находящихся в самом конце длинного текста, можно понять суть представленных на рисунке сведений. То же замечание относится к рисункам 70, 80, 82. Текст под этими рисунками начинается со слов «Спектры флуоресценции 100 мМ калий-

фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 50 мМ NaCl,....». В автореферате это замечание относится к рисункам 10,14, 16, 19, 21, 23, 26-28.

Это замечание и грамматические ошибки на стр. 18,23,115,203 в диссертации и на стр. 22 и 40 в автореферате не умаляют достоинства представленной работы.

Вопрос дискуссионного характера.

Параметры стационарной кинетики исследуемых цитохромов Р450, полученные с помощью разработанных биэлектродных ферментативных систем, отличаются от таковых, полученных в более трудоемких реконструированных Р450-зависимых системах определения кинетических параметров. Для каких-то ферментов эти параметры совпадают, для каких-то существенно отличаются в ту или иную сторону. Предполагаемые причины таких различий описаны в диссертации. Не может ли этот факт повлиять на результат при поиске новых лекарственных соединений и изучении межлекарственных взаимодействий или при исследовании ингибирующих свойств новых соединений? Нужно ли стремиться к устранению причин таких различий и есть ли для этого инструментарий?

Заключение

В заключение следует отметить, что диссертационная работа Кузикова А.В. по своей актуальности, научной новизне и практической значимости, объему и глубине проведенных исследований, достоверности полученных результатов и полноте изложения результатов в диссертации и опубликованных работах является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, проведенной на высоком научно-методологическом уровне, в которой решена актуальная научная проблема создания новых подходов для идентификации и количественного определения продуктов цитохром Р450-зависимых реакций, необходимых для решения различных биомедицинских задач.

На основании вышеизложенного считаю, что работа Кузикова А.В. «Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома Р450: идентификация метаболитов и кинетический анализ» является цельным законченным научным исследованием, которое содержит новые теоретические положения и оригинальное решение проблемы идентификации метаболитов, что

полностью соответствует требованиям п.9 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в редакции с последующими изменениями) предъявляемым к докторским диссертациям, а соискатель, заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Руководитель лаборатории биохимии
чужеродных соединений НИИМББ ФИЦ ФТМ,
доктор биологических наук,
профессор
Гришанова Алевтина Юрьевна



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

630060, Россия, г. Новосибирск, ул Тимакова, 2

Адрес официального сайта <http://frcftm.ru/>

Email: aiugrishanova@frcftm.ru.



Оксана Борисовна