

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора, профессора РАН, академика РАН Сычева Дмитрия Алексеевича на диссертационную работу Кузикова Алексея Владимировича «Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450: идентификация метаболитов и кинетический анализ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия

Актуальность темы диссертации

Цитохромы P450 – гем-содержащие монооксигеназы, участвующие в метаболизме лекарственных средств, а также в биосинтезе холестерина, стероидных гормонов, желчных кислот, простаноидов. Участие этих ферментов в метаболизме лекарственных средств обуславливает их важнейшую роль в развитии побочных эффектов фармакотерапии за счет ингибирования или индукции изоферментов цитохрома P450. Благодаря участию в метаболизме эндогенных соединений некоторые изоферменты цитохрома P450 являются молекулярными мишенями для действия лекарственных средств. Таким образом, изучение функциональной активности цитохромов P450 является важной задачей биохимии и фармакологии.

На сегодняшний день разработано большое количество методов для оценки каталитической активности цитохромов P450. Активно развиваются подходы, основанные на использовании электрохимических методов. Электрохимическое восстановление иона железа гема цитохрома P450 позволяет инициировать каталитическую реакцию по отношению к субстрату. При этом нет необходимости использовать восстанавливающие коферменты (NADPH) и дополнительные редокс-партнерные белки (NADPH-цитохром P450-редуктазу и цитохром b5). С помощью регистрации изменения электрохимических характеристик цитохромов P450 в присутствии субстратов могут быть определены кинетические параметры реакций, катализируемых этими ферментами. Таким образом, электрохимические подходы имеют ряд существенных преимуществ перед классическими методами, основанными на реконструировании монооксигеназных систем. Однако существует ряд научных проблем, ограничивающих широкое практическое применение электрохимических систем для исследования цитохромов P450. Регистрация электрохимических характеристик цитохромов P450, таких как изменение восстановительного тока в присутствии субстратов, отражает не только образование продукта монооксигеназной реакции, но и образование активных форм кислорода за счет разобщения каталитического цикла. Это, в свою очередь, может искажать реальные значения кинетических параметров, рассчитываемых только по изменению электрохимических характеристик. Таким образом, несмотря на очевидные достоинства электрохимических систем для исследования каталитической активности цитохромов P450, идентификация и количественное определение продуктов ферментативных реакций остаются необходимым условием для их применения. Определение продуктов

цитохром Р450-зависимых реакций является трудоемким процессом, сопряженным с многоэтапной пробоподготовкой реакционной смеси, применением хроматографических и масс-спектрометрических методов. Все это требует разработки новых подходов для идентификации и количественного определения продуктов цитохром Р450-зависимых реакций, протекающих в электрохимических системах. В связи с вышеизложенным, тема диссертационной работы Кузикова А.В. является несомненно актуальной.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа написана на 274 страницах печатного текста, имеет традиционную структуру изложения и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 377 источников, и приложения. Работа проиллюстрирована 84 рисунками и содержит 8 таблиц. Текст диссертации хорошо структурирован, последовательно и логично изложен.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель, задачи, положения, выносимые на защиту, описывает научно-практическую значимость, методологию исследования, новизну, степень достоверности и апробацию работы.

В главе «Обзор литературы» автор описывает современное представление о цитохром Р450-содержащих системах, их медицинское и фармакологическое значение, подробно рассматривает современные методы, использующиеся для исследования функциональной активности цитохромов Р450. Особое внимание в данной главе отводится принципам и системам для исследования активности цитохромов Р450, основанным на электрохимических методах, проблемам их практического использования. В целом обзор литературы отражает полноту владения автором информацией как о современных представлениях о молекулярной организации цитохром Р450-содержащих систем, так и о методологии, применяющейся для их исследования.

В главе «Материалы и методы» автором подробно описываются реактивы, препараты белков, экспериментальные методики и методы статистического анализа, использованные в работе. Подробность изложения материала в данной главе позволяет однозначно интерпретировать полученные в работе результаты.

В третьей главе диссертантом описываются и обсуждаются основные результаты работы. Первая часть данной главы посвящена описанию результатов по разработке методологии биелектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов Р450. Автором исследованы электрохимические свойства ряда соединений (андростендион, тестостерон, (S)-варфарин, диклофенак, (S)-напроксен, фенитоин и хлорзоксазон) и продуктов их цитохром Р450-зависимой биотрансформации (эстрон, β -эстрадиол, (S)-7-гидроксиварфарин, 4'-гидроксидиклофенак, 4-гидроксифенитоин и 6-гидроксихлорзоксазон). Показано, что продукты цитохром Р450-зависимых реакций ароматического гидроксирования,

деалкилирования и ароматизации могут быть идентифицированы за счет их прямого электрохимического окисления на электродах при потенциалах, отличных от потенциалов окисления исходных субстратов. Это позволило диссертанту разработать биэлектродную электрохимическую систему, в которой один из электродов служит для иммобилизации цитохромов P450 и одновременно является донором электронов для восстановления иона железа гема фермента, а второй электрод используется для качественного и количественного определения образующихся продуктов путем их электрохимического окисления при потенциалах, отличных от потенциалов окисления субстратов. Такой подход позволяет избежать реконструирования цитохром P450-содержащей системы, включающего использование дополнительных белков-переносчиков электронов, а также не проводить многостадийный процесс пробоподготовки инкубационной смеси для анализа продукта благодаря тому, что окисление продуктов реакций происходит при потенциалах, отличных от таковых для субстратов. С помощью разработанного подхода диссертантом исследованы особенности кинетики реакций, катализируемых CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 в электрохимических системах.

Во второй части третьей главы приводятся результаты разработки нового подхода для исследования каталитической активности CYP3A4. Диссертантом обнаружены различные флуоресцентные свойства продуктов химической дериватизации (после обработки раствором серной кислоты и этанола) кортизола, являющегося маркерным субстратом CYP3A4, и продукта его ферментативной биотрансформации – 6 β -гидроксикортизола. Это позволило Кузикову А.В. разработать систему, в которой CYP3A4 иммобилизован на электроде и восстанавливается электронами с электрода, что инициирует каталитическую реакцию по отношению к кортизолу, а образующийся метаболит (6 β -гидроксикортизол) определяется методом флуоресцентной спектроскопии при длине волны эмиссии, отличной от таковой для кортизола. С помощью данного подхода диссертантом изучена кинетика реакции гидроксилирования кортизола в электрохимической системе.

В заключении автор суммирует полученные в диссертационной работе результаты, а также дает оценку достигнутого общего прогресса в развитии электрохимических систем для определения активности цитохромов P450, сравнивая разработки в рамках своей диссертационной работы с разработками других коллективов.

В приложении диссертант приводит данные о лекарственных средствах и их метаболитах, которые могут быть определены с помощью разработанной биэлектродной системы, что делает данное приложение весьма полезным с практической точки зрения.

Все разделы диссертационной работы изложены достаточно подробно и последовательно, сформулированные выводы и положения, выносимые на защиту, экспериментально и логически обоснованы.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Научной значимостью работы является развитие концептуально нового подхода для определения активности цитохромов Р450 с помощью биэлектродной системы. Разработанная система позволила установить кинетические особенности протекания в электрохимических системах реакций, катализируемых цитохромами Р450 (CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1). Автором проведен сравнительный анализ полученных параметров стационарной кинетики реакций, катализируемых цитохромами Р450 в электрохимических и в реконструированных или микросомальных системах. С помощью биэлектродной системы установлен механизм переноса электронов в бактосомах при их иммобилизации на электроде, а также показана активирующая роль NADPH-зависимой цитохром Р450-редуктазы на каталитическую активность CYP2E1.

Диссертантом впервые обнаружены различия в спектрах флуоресценции кортизола и продукта его биотрансформации (6 β -гидроксикортизола) после химической дериватизации этих соединений. На основании этого был разработан способ определения активности CYP3A4, иммобилизованного на электроде, и изучена кинетика реакции гидроксирования кортизола.

Диссертационная работа, несомненно, имеет практическую значимость, поскольку предложенные подходы могут использоваться при решении задач фармакологии, таких как выявление ингибиторов цитохромов Р450, исследование механизмов их взаимодействия с ферментом, выявление особенностей кинетики биотрансформации субстратов, а также оценка межлекарственных взаимодействий. Кузиковым А.В. убедительно продемонстрирована возможность проведения ингибиторного анализа с помощью разработанных в диссертационной работе подходов на примере взаимодействия CYP19A1 с экзестаном, CYP2C9 с сульфafenазолом, CYP2C19 с флуконазолом и CYP3A4 с кетоконазолом.

Научная новизна диссертационной работы

Научная новизна полученных в диссертации результатов очевидна и не вызывает сомнения. Диссертантом впервые предложена и развита методология электрохимической идентификации и количественного определения продуктов электрокаталитических цитохром Р450-зависимых реакций. Изучены электрохимические свойства ряда метаболитов, образующихся при участии клинически значимых цитохромов Р450 CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1. Показано, что субстраты и их метаболиты, образующиеся в реакциях ароматического гидроксирования, деалкилирования или ароматизации, различаются по потенциалам окисления и могут быть определены электрохимическими методами. Автором впервые предложена и сконструирована биэлектродная система для определения активности цитохромов Р450, что позволило изучить особенности кинетики ферментативных реакций, протекающих в электрохимических системах. С помощью предложенной биэлектродной системы также был решен вопрос о механизме переноса электронов между электродом и компонентами монооксигеназной системы на примере CYP2E1-содержащих бактосом.

Автором был разработан новый подход для определения активности СУР3А4 по отношению к маркерному субстрату кортизолу, при котором фермент иммобилизован на электроде, а образующийся метаболит, 6 β -гидроксикортизол, определяется методом флуоресцентной спектроскопии после химической дериватизации.

Степень обоснованности и достоверность положений и выводов диссертационной работы

Основные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, четко аргументированы и обоснованы, базируются на результатах корректно спланированных и выполненных экспериментов. Диссертационное исследование выполнено на высоком теоретическом, методическом и экспериментальном уровнях. В работе используются современные методы электрохимического анализа (циклическая, квадратно-волновая, дифференциально-импульсная вольтамперометрии), применяются и оптические методы. Все полученные в ходе выполнения исследования экспериментальные данные воспроизводимы и статистически обработаны, их достоверность не вызывает сомнений. Результаты исследования, выводы, положения оригинальны и вносят значительный вклад в развитие электрохимических систем для исследования каталитической активности цитохромов Р450.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертационной работы полностью отражены в 29 печатных работах, в том числе в 21 статье в рецензируемых изданиях (19 из которых опубликованы в журналах категории К1) и 8 материалах конференций.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат хорошо структурирован, полностью отражает основные этапы и результаты исследования, выводы и положения, представленные в диссертации.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Несмотря на общее положительное впечатление о работе, возникли некоторые вопросы по диссертации:

Каково место идентификации новых лекарственных препаратов, как субстратов, ингибиторов или индукторов изоферментов цитохрома Р450, с помощью электрохимических систем?

Заменит ли данный подход традиционные методы (на микросомах человеческой печени и т.д.)?

Заключение

Диссертационная работа Кузикова Алексея Владимировича «Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома Р450: идентификация метаболитов и кинетический анализ» является завершенным

научным исследованием и по своей актуальности, научной новизне и практической значимости полученных в ходе ее выполнения результатов полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (в ред. с последующими изменениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Кузиков Алексей Владимирович, заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Доктор медицинских наук, профессор, академик РАН,
Заведующий кафедрой клинической фармакологии и терапии
имени академика Б.Е. Вотчала, и.о. ректора
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение дополнительного профессионального образования
«Российская медицинская академия непрерывного профессионального
образования»
Министерства здравоохранения Российской Федерации


Дмитрий Алексеевич Сычев

Подпись доктора медицинских наук, профессора, академика РАН Дмитрия
Алексеевича Сычева заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ДПО РМАНПО
Минздрава России, д.м.н., профессор




Татьяна Александровна Чеботарева

14.04.2015

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение дополнительного профессионального образования
«Российская медицинская академия непрерывного профессионального
образования»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Адрес: 123995, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, РМАНПО
Телефон: +7 (495) 680-05-99 доб.900
Электронная почта: rmaro@rmaro.ru