

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора химических наук Вакулина Ивана Валентиновича
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

Изучение цитохром P450-зависимых реакций играет важнейшую роль при разработке новых лекарственных препаратов, изучении фармакокинетики и оценке межлекарственных взаимодействий. Такого рода исследования сопряженные с определением активности цитохромов P450 так или иначе требуют нахождения количественных параметров уравнения Михаэлиса-Ментен, что в свою очередь предполагает большой объем кропотливых работ по пробоподготовке, инкубированию образцов, выделению и анализу метаболитов для установления кинетических зависимостей. Поэтому разработка доступных методов анализа активности цитохромов P450, в идеале не требующих специальных методов выделения метаболитов для их последующей идентификации, является важной задачей биохимии и фармакологии.

Как справедливо отмечает автор, среди множества активно развивающихся методов изучения каталитической активности цитохромов P450, подходы, основанные на электрохимических методах, представляются одними из самых перспективных. Действительно, электрохимическое восстановление иона железа в геме цитохрома P450 позволяет отказаться от реконструирования монооксигеназной системы и упростить каталитический цикл, за счет исключения необходимых восстанавливающих коферментов (NADPH) и дополнительных редокс-партнерных белков (NADPH-цитохром P450-редуктаза и цитохром *b₅*). Крайне важно, что эти же электрохимические методы, за счет введения второго аналитического электрода, вполне успешно могут быть применены и для определения концентраций метаболитов цитохром P450-зависимых реакций одновременно с их образованием, что позволит упростить процедуру анализа за счет исключения трудоемких процессов пробоподготовки. Несомненно, что успешная реализация предлагаемой в работе идеи биэлектродной системы открывает путь для создания удобных и высокопроизводительных аналитических систем по определению активности цитохромов P450.

С другой стороны для успешной реализации идеи биэлектродной системы требуется рассмотрение и изучение большого ряда важных факторов. В частности неясно, насколько велики искажения кинетических параметров, связанные с упрощением каталитического цикла и

появлением активных форм кислорода. Не вполне понятно каким образом иммобилизация цитохромов P450 на поверхности влияет на их электрохимические характеристики и способность генерировать количества метаболитов достаточные для регистрации на аналитическом электроде.

В этой связи диссертационная работа Кузикова А.В., посвященная изучению кинетических параметров электрохимических систем на основе изоферментов цитохрома P450, выявление возможности и необходимых условий для идентификации метаболитов непосредственно в реакционной смеси с целью разработки высокопроизводительных аналитических систем для анализа активности цитохромов P450, несомненно, является актуальной.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа представляет собой завершённый научный труд, выполненный в традиционном стиле. Работа представлена на 274 страницах печатного текста и включает все необходимые главы: введение; обзор литературы; материалы и методы; результаты и их обсуждения; заключения и выводы; список литературы из 377 источников; приложения.

Представленные в диссертации данные отражены в 8 таблицах и проиллюстрированы 84 рисунками. Текст диссертации хорошо структурирован, последовательно и логично изложен.

Введение диссертации раскрывает актуальность темы исследования, содержит хорошо сформулированные цель, задачи и положения, выносимые на защиту. Также во введении дано описание методологии исследования, представлена научно-практическая значимость работы, ее новизна, степень достоверности и апробация.

Представленный автором «Обзор литературы» весьма информативен, т.к. хорошо раскрывает терминологию, содержит большой объем результатов современных исследований, что позволяет составить достаточные представления о цитохром P450-содержащих системах, их медицинском и фармакологическом значении. Также рассмотрены принципы построения и варианты современных аналитических систем, применяемых для изучения активности цитохромов P450. В связи с тематикой работы особое внимание уделено системам, основанным на электрохимических методах, и проблемам возникающим в ходе их применения. Представленный обзор литературы дает возможность высоко оценить погруженность автора в тему, его хороший кругозор и степень понимания современных представлений как о молекулярной организации цитохром P450-содержащих систем, так и о методах и подходах, применяемых для их исследования.

В главе «Материалы и методы» автор подробно описывает реактивы, белковые препараты, экспериментальные методики и методы статистического анализа, задействованные

в работе. Представленные в данной главе материалы позволяют однозначно оценить адекватность выбора использованных подходов, объектов для исследования и интерпретацию полученных в работе результатов.

В главе «Результаты и их обсуждение» представляются основные результаты работы. В первой части автором рассмотрены результаты практической реализации предложенных им принципов построения биэлектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов P450. Согласно предложенному подходу один из электродов, являющийся рабочим, содержит иммобилизованный цитохром P450, при этом активность фермента восстанавливается за счет непосредственного переноса электронов с электрода. Второй электрод в системе, являющийся аналитическим, служит для детектирования продуктов ферментативной реакции путем их окисления. Автор справедливо полагает, что успешная реализация такого подхода заметно упростит систему и позволит проводить анализы в режиме реального времени.

Представленные экспериментальные данные доказывают не только сохранение достаточной активности использованных ферментов CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19 и CYP2E1 при их иммобилизации на поверхности, но и возможность протекания процессов регенерации активного центра ферментов без участия вспомогательных веществ. Это подтверждается параметрами уравнения Михаэлиса-Ментен и накоплением продуктов окисления в количествах достаточных для их надежной идентификации электроаналитическими методами.

Для обоснования возможности детектирования продуктов цитохром P450-зависимых реакций в ходе эксперимента автором представлены результаты изучения электрохимических свойств ряда специфичных субстратов цитохромов P450 (андростендион, тестостерон, (S)-варфарин, диклофенак, (S)-напроксен, фенитоин и хлорзоксазон) и продуктов их окисления (эстрон, β -эстрадиол, (S)-7-гидроксиварфарин, 4'-гидроксидиклофенак, 4-гидроксифенитоин и 6-гидросихлорзоксазон). Показано, что субстраты и соответствующие им продукты цитохром P450-зависимых окислительных реакций в условиях эксперимента имеют достаточную разность RedOx потенциалов, при этом продукты образуются в достаточных количествах и могут быть однозначно идентифицированы электроаналитическими методами на доступных графитовых электродах.

Во второй части обсуждения, на примере иммобилизованного на электроде фермента CYP3A4, автором продемонстрирован альтернативный подход построения аналитической системы для изучения активности цитохромов P450, в котором идентификация продуктов осуществляется методом флуоресцентной спектроскопии. Автором представлены не только исчерпывающие данные по кинетике ферментативного процесса с участием CYP3A4, но и показана достаточная разница в спектроскопических свойствах между субстратом (кортизол) и

соответствующим продуктом его ферментативного окисления (6 β -гидроксикортизол) в условиях эксперимента, что позволило автору практически реализовать альтернативную аналитическую систему для изучения активности цитохромов P450.

В заключении автор, помимо обобщения полученных результатов, приводит сравнение разработанных им аналитических систем с известными в литературе, отмечает критерии выбора, преимущества и перспективы использования своих аналитических систем для определения активности цитохромов P450.

В приложении в табличной форме приведены сведения справочного характера о ряде цитохромов P450, субстратов, являющихся лекарственными средствами, типах превращений с их участием и соответствующих метаболитах. Данное приложение представляется весьма практичным, т.к. позволяет сделать определенные заключения о применимости и облегчает выбор разработанных аналитических систем по отношению к заданному субстрату.

Выводы хорошо сформулированы, соответствуют цели и задачам работы и в обобщенной форме в полной мере отражают полученные автором результаты.

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

Автором впервые создан метод изучения и применения цитохромов P450 в научных и медицинских целях, основанный на совмещении процесса электрохимического восстановления цитохромов P450 непосредственно на электроде и электрохимического анализа продуктов цитохром P450-зависимых реакций на присутствующем в системе аналитическом электроде. Автором доказана возможность замены электроаналитического метода анализа на спектроскопический с сохранением всех полученных преимуществ.

С использованием разработанных аналитических систем автором установлены кинетические параметры и особенности протекания реакций, катализируемых иммобилизованными на электроде цитохромами P450 (CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1). Автором проведен сравнительный анализ полученных параметров стационарной кинетики реакций, катализируемых цитохромами P450 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 P450-редуктазы на каталитическую активность CYP2E1. Также автором, на примере взаимодействия CYP19A1 с экземестаном, CYP2C9 с

сульфафеназолом, CYP2C19 с флуконазолом и CYP3A4 с кетоконазолом, показана возможность проведения ингибиторного анализа с использованием

Диссертационная работа, несомненно, имеет практическую значимость, т.к. предложенный автором подход может быть применен для решения широкого круга биомедицинских задач связанных с изучением ферментативных превращений; открывает возможность для построения мультисенсорных систем; позволяет исключить сложные процессы пробоподготовки; применение дополнительных физико-химических методов анализа (хроматография, масс-спектрометрия и пр.); сократить время анализа вплоть до его проведения в режиме on-line.

Научная новизна диссертационной работы

Научная новизна полученных в диссертации результатов очевидна и не вызывает сомнения. Автором впервые предложена и доведена до практического воплощения идея электрокаталитической регенерации иммобилизованных цитохромов P450 совмещенная с идентификацией и количественным определением продуктов соответствующих цитохром P450-зависимых реакций. Автором предложены и апробированы электроаналитический и спектроскопический методы определения продуктов. На примере клинически значимых цитохромов P450 (CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) автором показано, что субстраты и их метаболиты, образующиеся в соответствующих реакциях, в условиях эксперимента имеют достаточную разность RedOx потенциалов, что позволяет надежно определять метаболиты электроаналитическими методами на доступных графитовых электродах. Созданная автором биэлектродная система для определения активности цитохромов P450 позволила изучить особенности кинетики ферментативных реакций, протекающих в электрохимических системах с участием иммобилизованных ферментов CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 и CYP3A4.

На примере реакции, катализируемой ферментом CYP3A4, с участием кортизола изучены возможности альтернативной аналитической системы по определению активности цитохромов P450, в которой образующийся метаболит (6 β -гидроксикортизол) определяется с помощью метода флуоресцентной спектроскопии.

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 P450.

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 K1) 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 положительное впечатление, по работе имеется ряд вопросов и замечаний:

1. Неудачно сформулированы некоторые тезисы теоретической значимости работы. Различия в спектрах или электрохимических свойствах субстратов и продуктов их окисления логично вытекают из разницы в их структурах и могут быть зафиксированы без выполнения текущего исследования. Скорее следовало бы отметить, что чувствительности и активности предложенных биэлектродных систем, а также установленной разности в свойствах субстратов и метаболитов, достаточно для их надежной идентификации при совместном присутствии в условиях эксперимента.

2. Автором найдены значения констант в уравнении Михаэлиса-Ментен для реакций с участием иммобилизованных ферментов, что позволяет не только судить о влиянии поверхности на изменение активности и сродства ферментов к субстрату, но и делать прогнозы имеющие значения для практической реализации предлагаемых подходов. К сожалению, автор детально проанализировал эти данные не для всех изученных систем.

3. На мой взгляд не лучшим образом подобрано оформление графиков в тесте диссертации. Выполненное в цвете, оно совершенно иначе выглядит в черно белом печатном варианте и затрудняет анализ данных и отнесение кривых ввиду их слабой различимости.

4. Существенным расширением разработанного автором метода идентификации метаболитов цитохром Р-450 зависимых реакций с помощью биэлектродных систем, включающих электроды с иммобилизованными ферментами, явилось бы рассмотрение возможности определения метаболитов в реальных объектах (моча, плазма крови и т.д.).

Представленные выше замечания никоим образом не влияют на ценность и значимость полученных автором результатов.

Заключение

Диссертационная работа Кузикова Алексея Владимировича «Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450: 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.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры органической и
биоорганической химии ФГБОУ ВО
«Уфимский университет науки и
технологий», доктор химических наук

 / Вакулин Иван Валентинович

« 22 » апреля 2025 г.

Подпись д.х.н. Вакулина Ивана
Валентиновича

заверяю:

Ученый секретарь

«Уфимский университет науки и
технологий»



 / Ефименко Наталья Вячеславовна

« 22 » апреля 2025 г.

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Уфимский университет науки и технологий»

Адрес: 450076, Российская Федерация, Республика Башкортостан, г.Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32

Телефон: +7 (347) 272-63-70

Электронная почта rector@uust.ru