

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор – проректор по научной
деятельности ФГАОУ ВО «Казанский
(Приволжский) федеральный университет»



д.ф.м.н., профессор

Д.А. Таюрский

«14» апреля 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Кузикова Алексея Владимировича на тему
«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 исследования. Исследование метаболизма лекарственных соединений, выявление ингибиторов/активаторов и оценка межлекарственных взаимодействий являются важными задачами современной биохимии и фармакологии, решение которых напрямую связано с качеством и продолжительностью жизни человека. Одним из основных путей биотрансформации лекарственных веществ в организме является их гидроксилирование, окисление, эпоксидирование, деалогенирование, деаминирование и N-, O- и S-деалкилирование под действием ферментов семейства цитохрома P450. Поэтому определение кинетических параметров цитохром P450-зависимых реакций имеет принципиальное значение. Для этого необходимы простые, экспрессные и надежные способы идентификации и определения метаболитов, образующихся при протекании цитохром P450-зависимых каталитических реакций.

Гем-тиолатные ферменты суперсемейства цитохрома P450 являются электрохимически активными за счет присутствия иона железа, способного к восстановлению на электродах, что позволяет применять электрохимические методы для исследования редокс-реакций с их участием и оценки кинетических параметров. При этом в ряде случаев можно проводить идентификацию метаболитов без использования независимых и трудоемких методов, таких как

хроматография и масс-спектрометрия. Одним из перспективных подходов для решения такой задачи можно рассматривать разделение процессов, протекающих в исследуемой системе, за счет использования двух электродов, на одном из которых проводят иммобилизацию цитохромов P450 и идет их восстановление, а на втором регистрируют образующиеся метаболиты по пикам их электрохимического окисления при потенциалах, отличных от потенциалов окисления субстратов. Эта стратегия исключает необходимость разделения компонентов инкубационной смеси и характеризуется высокой чувствительностью отклика целевых метаболитов.

В этой связи **цель** представленной диссертации А.В. Кузикова, связанная с разработкой электрохимических систем для идентификации метаболитов и кинетического анализа цитохром P450-зависимых реакций, является **актуальной, научно и практически значимой**.

Научная новизна исследований и их практическая значимость. Диссертационная работа А.В. Кузикова – комплексное систематическое исследование, направленное на выявление и изучение свойств ингибиторов цитохромов P450. Автором впервые предложена методология электрохимической идентификации и определения продуктов электрокаталитических цитохром P450-зависимых реакций. Установлены электрохимические характеристики продуктов цитохром P450-зависимых реакций ароматического гидроксирования, деалкилирования и образования ароматических соединений с участием клинически значимых цитохромов P450 19A1, 2C9, 2C19, 2E1. Разработана новая электрохимическая система для оценки активности цитохромов P450 (CYP19A1, CYP2C9, CYP2C19 и CYP2E1), основанная на использовании двух электродов (на одном иммобилизуют рекомбинантные или мембраносвязанные цитохромы P450, а на другом регистрируют пики электроокисления образующихся продуктов). Представляет интерес подход к оценке активности CYP3A4 по отношению к маркерному субстрату гидрокортизону, основанный на электродной ферментативной реакции с последующим определением образующегося 6 β -гидрокортизола методом флуоресцентной спектроскопии после химической дериватизации.

Полученные результаты могут использоваться для контроля каталитической активности цитохромов P450 при разработке новых подходов к их иммобилизации

на электродной поверхности. Практическая значимость исследования не вызывает сомнений. Представленные данные вносят вклад в решении прикладных задач энзимологии цитохромов P450, востребованы при моделировании ферментативных процессов в фармакологических исследованиях для *in vitro* оценки фармакокинетических параметров биотрансформации лекарственных соединений, выявления и изучения свойств ингибиторов, что, в свою очередь, необходимо для поиска новых лекарственных соединений и прогноза межлекарственных взаимодействий.

Структура диссертации и основное содержание работы. Диссертация имеет традиционное строение, изложена на 274 страницах компьютерной верстки, включая приложение и благодарности (6 страниц). Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и содержит 8 таблиц, 84 рисунка и библиографию из 377 наименований.

Во введении представлены актуальность темы диссертации и степень ее разработанности, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, личный вклад соискателя, а также положения, выносимые на защиту. Представлены сведения об апробации работы и публикациях по ее теме.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором достаточно подробно рассмотрены ферменты семейства цитохромов P450, их функции и функционирование в живых системах, а также способы оценки их активности. Особое внимание уделено электрохимическим системам на основе цитохромов P450 с акцентом на механизмы формирования отклика в условиях электрокатализа и способы определения активности по электрохимическим данным, в том числе с использованием биелектродных электрохимических систем. Кроме того, достаточно подробно рассмотрены возможности электрохимического определения метаболитов лекарственных соединений, образующихся в результате воздействия изоферментов цитохрома P450. В заключении к этой главе удачно обобщены достижения в области электрохимических систем для определения активности иммобилизованных на электроде рекомбинантных и мембраносвязанных цитохромов P450. Представленный материал, характеризуется высокой степенью обобщения, глубиной и достаточной степенью критического анализа.

Во второй главе (материалы и методы) подробно описаны реактивы, препараты ферментов, приборная база и методы исследования, в том числе математическая и статистическая обработка данных.

Третья глава посвящена собственным результатам и их обсуждению. В первой части представлена методология биэлектродной электрохимической системы для определения активности цитохромов P450 и ее применение для оценки каталитической активности CYP19A1 по отношению к андрогенам, CYP2C9 – к (S)-варфарину, диклофенаку и (S)-напроксену, CYP2C19 – к фенитоину, CYP2E1 – к хлорзоксазону. Показана возможность электрохимического определения продуктов цитохром P450-зависимых реакций с участием вышеуказанных лекарственных соединений по характеристикам их анодных пиков, регистрируемых в условиях квадратно-волновой вольтамперометрии, без разделения анализируемой смеси. Установлены кинетические профили ферментативных реакций и рассчитаны соответствующие количественные параметры. Показана возможность успешного применения такой системы при проведении анализа ингибиторов. Вторая часть главы посвящена определению метаболитов электрокаталитических цитохром P450-зависимых реакций с помощью флуоресцентной спектроскопии на примере 6 β -гидроксилирования гидрокортизона при участии CYP3A4. Показано, что 6 β -гидрокортизол после обработки смесью серной кислоты и этанола обладает флуоресцентными свойствами, что позволяет оценить гидроксилазную активность иммобилизованного на электроде CYP3A4 по отношению к гидрокортизону. Подход является альтернативой биэлектродной системы, поскольку для CYP3A4 известно ограниченное число субстратов, образующих электроактивные метаболиты.

В заключении диссертации обобщены результаты и подведены итоги проведенного исследования, а также отмечены перспективы его дальнейшего развития. Выводы следуют из представленного фактического материала, сформулированы на высоком научном уровне, логичны и отражают основные достижения проделанной работы.

В приложении представлены катализируемые цитохромами P450 реакции метаболизма лекарственных препаратов, приводящие к образованию гидроксильных групп в ароматическом кольце, что еще раз подчеркивает

потенциальные возможности практического применения разработанных подходов и их перспективность.

Следует отметить, что диссертационная работа А.В. Кузикова характеризуется системным подходом к решаемой проблеме. Все главы и разделы логично связаны между собой и органично обобщены в заключении и выводах.

Достоверность полученных результатов. Обоснованность положений, выносимых на защиту, и выводов по работе. Достоверность представленных в работе данных определяется большим объемом экспериментального материала, полученного с применением современных электрохимических и спектральных (молекулярная абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия) методов исследования на сертифицированном оборудовании, а также грамотным планированием эксперимента. Обработка полученных экспериментальных данных проведена методами математической статистики. Полученные результаты согласуются с литературными сведениями.

Объем полученных теоретических и экспериментальных данных достаточен для обоснования выносимых на защиту положений. Выводы по работе полностью соответствуют ее содержанию.

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 21 статье в рецензируемых научных изданиях и 8 работах в сборниках научных трудов. Работа прошла всестороннюю апробацию на профильных научных конференциях всероссийского и международного уровня.

Необходимо отметить, что диссертационная работа А.В. Кузикова выполнялась при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований, Российского научного фонда, Государственного задания на выполнения поисковых научных исследований, Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг, Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) и Проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационного исследования. С материалами диссертационной работы

рекомендуется ознакомить научные и образовательные учреждения, занимающиеся разработками в области энзимологии и фармакологии: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины им. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. Полученные результаты и выводы могут быть использованы в качестве иллюстративного материала в курсах лекций по энзимологии, фармакологии, биоэлектрохимии и биосенсорам.

Замечания и вопросы по диссертации. Замечания по существу представленных данных и уровню их обсуждения отсутствуют. Однако следует отметить некоторые недостатки, не имеющие принципиального характера:

1. В главе 1 избыточное число подразделов четвертого уровня, что приводит к необоснованной фрагментации материала и нарушению его целостного восприятия. Логично было бы объединить их в рамках одного подраздела третьего уровня, в частности, это касается подразделов 1.4.2.1–1.4.2.6.
2. С. 106, рис. 17, рассмотрение наблюдаемых слабо выраженных редокс-ступеней как пиков не совсем корректно. Кроме того, с увеличением скорости сканирования потенциала форма ступеней искажается. С чем связано такое поведение СYP19A1?
3. Для ряда рассматриваемых изоферментов цитохрома P450 не достигается идеальная обратимость ферментативного редокс-процесса. Насколько корректно в этом случае использовать описанные в работе уравнения для расчета численных параметров? Следует ли принять в этом случае какие-то допущения и приближения?
4. Для различных ферментов и субстратов время ферментативной электрокаталитической реакции варьируется в разы. Каким образом проводили выбор времени реакции? Насколько будут зависеть результаты определения

- метаболитов от времени ферментативной электрокаталитической реакции?
5. С чем связана высокая длительность ферментативных реакций на электроде вплоть до 90 мин? Насколько востребована будет такая методика в практическом аспекте?
 6. В работе не обсуждается влияние метанола и глицерина на результаты исследования. Как их присутствие сказывается на поведении ферментов?
 7. Таблицы 2, 3, кинетические параметры, полученные с использованием различных подходов, варьируются в широких пределах. Как в этом случае оценивать и сопоставлять их между собой? Какой метод считается стандартным для решения поставленных в работе задач?
 8. Для многих количественных данных, в том числе уравнениях, указано избыточное число значащих цифр как в средних значениях величин, так и в значениях стандартного отклонения.
 9. По всей диссертации на графиках и в уравнениях, описывающих зависимости аналитического сигнала (тока пика или интенсивности флуоресценции) указана равновесная концентрация метаболитов, вместо молярной концентрации.
 10. В работе присутствуют некорректные термины. Так, на С. 26, 49, 64, 78 «восстановительный и окислительный пики» вместо «пики восстановления и окисления». По всему тексту диссертации вместо «количественное определение» следует использовать «определение», поскольку оно априори является количественной мерой.
 11. В тексте диссертации встречаются опечатки и неудачно сформулированные фразы.

Отмеченные замечания не снижают общую положительную оценку работы. В целом диссертация производит впечатление законченного исследования, проведенного на высоком научно-методическом уровне, и соответствует специальности 1.5.4. Биохимия. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Заключение

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа А.В. Кузикова «Электрохимические системы на основе изоферментов цитохрома P450: идентификация метаболитов и кинетический анализ» является законченным научным исследованием, в которой содержится решение научной проблемы,

которую можно квалифицировать как научное достижение в области ферментативного анализа. По объему, актуальности и научной новизне работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения 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.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», протокол № 14 от «10» апреля 2025 г.

И.о. заведующего кафедрой аналитической химии
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»,
доктор химических наук, профессор

Зиятдинова Гузель Камилевна

Доцент кафедры аналитической химии
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»,
кандидат химических наук, доцент

Порфирева Анна Вениаминовна

Почтовый адрес: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,
Тел.: +7 (843) 233-77-36. Адрес электронной почты: Guzel.Ziyatdinova@kpfu.ru;
porfireva-a@inbox.ru

11 апреля 2025 г.

