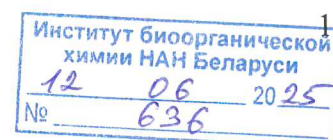


ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Гилепа Андрея Александровича
«Молекулярная организация и новые биохимические функции
стероид-гидроксилаз», представленной на соискание ученой степени
доктора химических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»

1. Соответствие диссертации отрасли науки и паспорту заявленной специальности

По своему содержанию, степени новизны положений, выносимых на защиту, полученным результатам, методике проведенного исследования, диссертационная работа кандидата химических наук Гилепа Андрея Александровича «Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук, соответствует отрасли «Химические науки» и специальности 03.01.04 – биохимия, разделам I, II и III Паспорта специальности, в частности, пунктам из раздела III: 3. Функционирование надмолекулярных комплексов и ферментных систем, структура и функции мембран, перенос вещества через мембраны. Закономерности биохимических процессов, включая термодинамику, кинетику и механизм действия ферментов как биокатализаторов, механохимических явлений и биоэнергетики, акцептирования и использования энергии света и фотосинтеза, фиксации азота; выделение и реконструирование молекулярных ансамблей. Моделирование биохимических процессов *in vitro* и *in silico*; 4. Термодинамические, квантово-механические и кинетические расчеты на уровне функционирования отдельных молекул, компьютерное моделирование пространственной структуры биополимеров и надмолекулярных комплексов. Молекулярная динамика и докинг. 7. Особенности строения и свойств различных биорегуляторов и структурных биополимеров, специфика биоэнергетических процессов, сигнальных и метаболических путей у организмов различных систематических групп. Проблемы сравнительной и эволюционной биохимии. 10. Метаболизм ксенобиотиков в организме. Наркотические вещества. Прокарциногены. Влияние чужеродных веществ, в том числе этилового спирта и продуктов их распада на состояние обменных процессов. Ферментные системы, участвующие в превращениях ксенобиотиков, и их регуляция; 11. Разработка биохимических методов исследования живых систем и способов получения веществ, корректирующих нарушение обменных процессов в организме; 12. Химические основы функционирования важнейших систем живой клетки с использованием химических методов, включая структурный и стереохимический анализ, частичный и полный синтез природных соединений и их аналогов, разработку препаративных методов получения природных веществ и их химических модификаций в непосредственной связи с биологической функцией этих соединений; 13.



Химические аспекты иммунологического и молекулярно-биологического анализа низкомолекулярных биорегуляторов, белков, генетических маркеров, фармацевтических субстанций, токсичных веществ и других биологически активных соединений. Создание средств иммунохимической, молекулярно-биологической и биохимической диагностики; 15. Анализ, выделение и синтез биологически активных веществ, включая создание ферментов и белков с заданной специфичностью, выяснение их физиологического действия, установление взаимосвязи «структура-функция» и возможностей применения полученных веществ; 16. Методы выделения веществ из биологического материала, очистка, установление строения, получение препаратов для биомедицинского использования (на основании паспорта данной специальности, утвержденного приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 23.04.2018 № 116).

Диссертационная работа Гилепа А.А. соответствует требованиям Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий от 17.11.2004 г.

На основании анализа содержания диссертационной работы Гилепа А.А., автореферата, опубликованных результатов, направлений научных тематик и программ, в рамках которых соискателем выполнялись научные исследования, по предмету и объектам исследования, методам, полученным результатам, выводам и основным положениям, выносимым на защиту, полностью соответствует отрасли «химические науки» и паспорту специальности 03.01.04 – «биохимия».

2. Актуальность темы диссертации

Актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений, она представляет собой завершенное научное исследование, выполненное в актуальной области современной биохимии.

Стероидные гормоны присутствуют у всех представителей хордовых. Насекомые, ракообразные и паукообразные имеют отличные от хордовых гормоны данного типа – экдизоны. Существуют специализированные органы и клетки, ответственные за биосинтез стероидных гормонов. К таким органам относятся кора надпочечников, семенники и яичники. В период беременности одной из ведущих тканей, синтезирующей гормоны, является плацента. Помимо этого, фактически любая клетка человеческого организма способна катализировать реакции с участием стероидов. Как и для большинства биологически активных соединений, для стероидов характерны процессы биосинтеза и деградации. Образование стероидных гормонов происходит, как правило, в стероид-секретирующих железах под контролем нейрональных либо гуморальных (адренокортикотропного, лютеотропного и некоторых других гормонов) факторов. Реакции биосинтеза стероидных гормонов проходят либо в мембранах эндоплазматического ретикулума, либо во внутренней мембране митохондрий. Деградация стероидных гормонов происходит в клетках-мишенях и включает реакции гидроксилирования либо

присоединения дополнительной функциональной группы. Стероидные гормоны взаимодействуют с рецепторами, расположенными в плазматической или ядерной мембране клеток-мишеней. Ключевую роль в модификации стероидов играют стероид-гидроксилазы.

Стероид-гидроксилазы входят в состав различных регуляторных систем организма, а их активность зависит от электронных доноров и модуляторов активности. Модуляторы активности воздействуют не только на эффективность каталитического процесса, но также на субстратную специфичность и спектр образующихся продуктов. Важным аспектом исследования стероид-гидроксилаз является поиск низкомолекулярных модуляторов активности этих ферментов, что позволяет в будущем разрабатывать новое поколение лекарств для лечения онкологических, инфекционных и эндокринных заболеваний.

Поэтому ключевой задачей является определение субстратной специфичности и спектра образующихся под действием стероид-гидроксилаз продуктов, выявление ингибиторов данных фармацевтически значимых ферментов, а также проведение комплексных интерактивных исследований в области анализа белок-белковых взаимодействий. Консолидация знаний о молекулярной организации и функционировании стероид-гидроксилаз способствует пониманию ключевых регуляторных процессов в организме человека, патогенеза различных заболеваний, а также предоставляет возможность применения рационального подхода в создании новых терапевтических средств, механизм действия которых связан с данными ферментативными системами.

Таким образом диссертационная работа посвящена чрезвычайно актуальной теме как в области фундаментальных исследований, так и в области фармацевтических разработок.

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям: научно-технической деятельности в Республике Беларусь на:

– 2011-2015 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 22.07.2010 г. № 378): «Медицина, медицинская техника и технологии, фармация», 21. Макротехнология «Диагностика и лечение заболеваний», критические технологии: диагностика и лечение инфекционных заболеваний; 23. Макротехнология «Лекарственные, лечебно-диагностические препараты и тест-системы», критические технологии: производство диагностикумов, средств иммунохимического микроанализа, тест-систем нового уровня;

– 2016-2020 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 г. № 166): «Медицина, фармация, медицинская техника» - технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы.

– 2021-2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 07.05.2021 г. № 156): «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства» - биотехнологии (геномные и постгеномные,

клеточные, микробные, медицинские, промышленные); диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи; фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, лекарственные средства и иммуномодуляторы;

фундаментальных и прикладных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585): 2. Супрамолекулярная химия, химический синтез новых веществ и материалов с заданной структурой, функциональными и физико-химическими свойствами. Новые химические продукты и технологии; 2.2 биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты; 3. Физико-химические основы биологии. Биотехнологии, биологическая энергетика и биотопливо; 3.1. биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, ее надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов; 3.6. идентификация и картирование генов; паспортизация, маркирование, идентификация, селекция и создание сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов с помощью ДНК-технологий; ДНК-технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных;

научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190): 3 Биологические системы и технологии. 4. Медицина и фармация;

научной, научно-технической и инновационной деятельности Республики Беларусь на 2021-2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь 07.05.2020 № 156): п.п. 2 Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства (биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные); системная и синтетическая биология; персонифицированная медицина; фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, антибиотикорезистентность).

Современные биотехнологические разработки отнесены к V технологическому укладу и рассматриваются как важные для инновационного развития экономики (Приказ Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь № 166 от 06.06.2017)

Актуальность работы подтверждена реализацией следующих исследований, выполненных в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси: ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал», подпрограмма «Химфармсинтез», задание 2.13 «Структурно-функциональный анализ рекомбинантных цитохром Р450-зависимых ферментов с целью создания лекарственных препаратов нового поколения» (2011-2013 гг., № гос. рег.

20121693); ГП «Инновационные биотехнологии», подпрограмма «Малотоннажные биотехнологии», задание 9.1 «Разработка технологий получения высокоочищенных препаратов рекомбинантных ферментов и создание производственно-технологического участка по их выпуску» (2013-2015 гг., № гос. рег. 20131769); гранта на выполнение научно-исследовательских работ докторантами и аспирантами Национальной академии наук Беларуси «Молекулярное клонирование и характеристика стероид-14-деметилаз патогенных грибов отдела Ascomycota» (2013 г., № гос. рег. 20132238); гранта БРФФИ, Наука № X17-013 «Синтез, структурный и биохимический анализ стероидов с гетероциклическим фрагментом в цикле D» (2017-2019 гг., № гос. рег. 20171270); ГП «Наукоемкие технологии и техника», подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии – 2020», мероприятие 40 «Разработать протокол идентификации грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции» (2016-2020 гг., № гос. рег. 20170199); ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма 2 «Биологически активные вещества» Химические технологии и материалы, задание 2.20 «Интерактомика и метаболомика стероид-гидроксилирующих монооксигеназ» (2016-2020 гг., № гос. рег. 20162001); ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», подпрограмма 2 «Химические основы процессов жизнедеятельности» (Биооргхимия), задание 2.3.1 «Дизайн, синтез, структурный и биохимический анализ потенциальных ингибиторов и субстратов ключевых ферментов человека, вовлеченных в процессы возникновения и развития тяжелых патологических состояний» (2021-2025 гг., № гос. рег. 20210590); гранта БРФФИ № X23РНФ-090 «Оценка метаболизма и эффективности связывания разных классов изопреноидных, полифенольных и хиноидных метаболитов с активным центром фармацевтически значимых ферментов человека и патогенных микроорганизмов» (2022-2024 гг., № гос. рег. 20230019).

3. Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту

Результаты диссертационной работы, на основании которых сформулированы положения, выносимые на защиту, получены впервые и опубликованы автором в рецензируемых профильных журналах. Новизна полученных данных подтверждается также высоким уровнем цитирования опубликованных в соавторстве Гилепа А.А. работах (индекс цитирования для некоторых превышает 100).

К наиболее значимым в научном плане результатам относятся следующие:

- Установлены особенности молекулярной эволюции CYP17 и CYP51.
- Впервые установлено участие ферментов *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов.
- Впервые установлено участие стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов на уровне изолированных ферментов в каталитическом превращении 5,7-диен-стероидов.

- Установлено, что белки группы PGRMC относятся к группе гемопротеинов.

- Установлены кинетические и термодинамические параметры взаимодействия стероид-гидроксилаз с белками партнерами.

- Установлены потенциальные модуляторы активности стероид-гидроксилаз из числа производных стероидов, азолов и полифенолов, а также олигонуклеотидных аптамеров.

В диссертационной работе Гилепа А.А. предложен новый подход к получению рекомбинантных мембранных гемопротеинов суперсемейства цитохромов P450, а также получены новые экспериментальные и теоретические данные в области молекулярной организации и функций стероид-гидроксилаз.

Из всего вышеприведенного следует, что результаты диссертационного исследования Гилепа А.А., а также научные положения, выносимые на защиту, являются новыми.

4. Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов, обоснованность выводов и рекомендаций, изложенных в диссертационной работе не вызывает сомнений. Научные положения и выводы, представленные в работе, основываются на экспериментальном материале, полученном с использованием современных методов и высокоточной приборной базы в области генетической инженерии, выделения и очистки рекомбинантных ферментов, изучения физико-химических и каталитических свойств белков, а также методов молекулярной биохимии. Обработка полученных результатов выполнена корректно, выводы аргументированы, обоснованы и не вызывают сомнений.

Протоколы методик описаны полно и с достаточным количеством деталей, необходимых для надежной воспроизводимости результатов. Экспериментальная часть показывает высокий уровень подготовки и квалификации автора. Сделанные заключения и рекомендации базируются на корректном анализе большого объема полученных собственных экспериментальных данных, сведений из литературных источников и четко аргументированы.

Результаты диссертационного исследования апробированы на международных конференциях и опубликованы в авторитетных отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях, в том числе в 14 статьях в журналах первого квартала, а также широко представлены на международных конференциях.

5. Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость диссертационной работы — выполнено фундаментальное исследование в области СYP-зависимого каталитического

превращения стероидов, позволившее разработать конвергентный подход к комплексному установлению взаимосвязи молекулярной организации ферментов семейства CYP и регуляции функционирования в условиях превращения стероидов по дельта-5, дельта-4, смешанному дельта-4/5 и дельта-5,7 пути. Созданы уникальные векторные конструкции для гетерологической экспрессии в *E.coli* и получены в высокоочищенном состоянии более 15 CYP из организмов, относящихся к разным таксонам, в том числе не менее 10 CYP человека, рекомбинантных NADPH-цитохром P450 редуктазы (CPR) и цитохрома b5.

Выявлены закономерности молекулярной эволюции стероид-гидроксилаз и особенности механизмов взаимодействия участников CYP-зависимых митохондриальных и микросомальных систем с редокс-партнерами и модулирующими агентами (CPR и Adx, цитохром b5 и PGRMC).

Установлены уникальные, неизвестные ранее фундаментально важные факты: (1) CYP11A1 и CYP17A1 участвуют в каталитическом превращении 5,7-диен-стероидов и секостероидов, (2) белки группы PGRMC относятся к группе гемопротеинов, (3) CYP *M. tuberculosis* участвуют в катализе реакций трансформации иммуноактивных стероидов.

Несомненную *практическую, экономическую и социальную значимость* проведенных работ представляют внедренные результаты в практику клинической медицины.

Практическая значимость работы определяется тем, что разработанная в ходе исследования система высокопроизводительного скрининга ингибиторов каталитической активности цитохрома P450 2C9, изоформы *1, *2 и 9*3 (ЛТР № 6/2015 –ЛТР от 17.09.2015) может быть использована для оценки ингибирующего действия различных химических соединений на каталитическую активность CYP2C9 и его полиморфных изоформ.

Также разработан метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9 и утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкция по применению данного метода (регистрационный номер №097-1117 от 01.12.2017), издано под грифом Министерства здравоохранения Республики Беларусь учебно-методическое пособие «Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования у пациентов с психическими и поведенческими расстройствами при назначении психотропных средств» (Минск, 2016 год), которые используются в медицинской практике врачами-психиатрами-наркологами, оказывающими медицинскую помощь пациентам, страдающим шизофренией, шизотипическими или бредовыми расстройствами для назначения подходящего лекарственного средства и его правильной дозировки (подтверждено актом о внедрении от 15.10.2017).

Разработанная компьютерная программа «Информационная система для интерпретации результатов фармакогенетического тестирования пациентов при психических и поведенческих расстройствах «Фармакогенетика» включена в Государственный регистр информационного ресурса (регистрационное

свидетельство № 1761713368 от 08.11.2017), внедрена в медицинские учреждения психиатрического профиля и используется для персонализированного подбора лекарственной терапии психотропными лекарственными средствами (подтверждено актами о внедрении от 01.12.2017 и от 07.12.2017).

Разработаны алгоритм и метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов и утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкция по применению указанного метода (регистрационный № 008-1119 от 10.12.2019), которые применяются для быстрого и эффективного определения видовой принадлежности патогенных грибов с использованием микробиологических, молекулярно-биологических и масс-спектрометрических методов исследований (подтверждено актом о внедрении от 24 февраля 2020 г.).

На основании разработанных методик организовано производство препарата ферментного «Рекомбинантный цитохром CYP51 грибов» (опытно-промышленный регламент № ОПР-904/2021 от 07.07.2021).

Идентифицированные лиганды стероид-гидроксилаз могут быть использованы для создания специфических модуляторов белок-белковых и белок-лигандных взаимодействий фармацевтически значимых стероид-гидроксилаз.

Полученные препараты стероид-гидроксилаз могут быть использованы для биотехнологического получения производных стероидов.

Социальная значимость результатов диссертационного исследования заключается также в том, что они могут активно использоваться в учебном процессе профильных кафедр высших учебных заведений страны, что повысит научный уровень преподавания, а также позволит подготовить кадры высшей квалификации при выполнении курсовых, дипломных и магистерских работ.

6. Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационного исследования соискателя (26 статей, среди которых 14 статей в журналах первого квартала) опубликованы в международной рецензируемой научной литературе химического профиля, соответствующей пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь. Кроме того, полученные результаты неоднократно апробированы на различных конференциях и симпозиумах (1 статья в сборниках научных трудов и тезисы 10 докладов). Общее количество опубликованных печатных работ 39 (32,98 авторских листа). Публикации результатов диссертационной работы удовлетворяет требованиям ВАК, в статьях раскрыты основные положения и выводы, изложенные в диссертации.

7. Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертационная работа написана современным научным языком, что позволяет ориентироваться в материале, и говорит о высокой квалификации

диссертанта. Данные физических методов исследований синтезированных соединений представлены в ясной форме и не дают оснований сомневаться в правильности их интерпретации. Толкование наблюдаемых закономерностей проводилось в согласии с известными представлениями и данными современных научных публикаций.

Диссертация состоит из перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, основной части работы, состоящей из 3 глав, заключения, списка использованных источников и приложения. Диссертация изложена на 191 странице, содержит 21 рисунок, 22 таблицы и 6 приложений. Список использованных источников состоит из библиографического списка, включающего 237 наименований, и списка публикаций соискателя ученой степени, включающего 39 наименований. Обсуждение результатов проведено лаконично, корректно и аргументировано, сопровождается необходимыми ссылками на литературные источники, схемами превращений, рисунками и таблицами. Оформление диссертационной работы и автореферата соответствует требованиям ВАК Беларуси. Автореферат информативен, полностью и корректно отражает сущность проведенного диссертационного исследования.

8. Замечания по диссертации

При прочтении работы возник ряд вопросов:

1. На основании каких критериев осуществлялся отбор стероидогенных тканей разных видов?
2. Для экспрессии рекомбинантных белков в работе использовалась *Escherichia coli*, пробовали ли другие системы для экспрессии белков хотя бы на уровне эксперимента?
3. Планируется ли использовать полученные ферменты для биотехнологического получения производных стероидов и если да, то каких?
4. Существует ли корреляция между спектрофотометрическим титрованием и SPR-анализом при исследовании белок-лигандных взаимодействий?
5. Каковы планируемые направления дальнейших исследований механизмов функционирования стероид-гидроксилаз?

Приведенные вопросы не затрагивают суть работы, ее основные положения и выводы, не снижают ценность полученных результатов и не меняют общую положительную оценку.

9. Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени доктора наук

Представленные в диссертационной работе Гилепа А.А. результаты и научные положения свидетельствуют о том, что соискатель на высоком уровне владеет методологиями биохимических, молекулярно-биологических,

биоинформационных и структурно-биологических исследований. Соискатель представляет собой специалиста высоко профессионального уровня, который в совершенстве владеет технологией получения и комплексного исследования рекомбинантных ферментов (в диссертации описано получение и анализ более 20 белков животных и патогенных микроорганизмов), что позволяет ему ставить амбициозные проекты в области биохимии стероидов. Научный уровень диссертации свидетельствует о высокой квалификации автора.

Содержание диссертации, характер поставленных задач, уровень обсуждения, научная и практическая значимость полученных результатов, а также стиль их изложения позволяют сделать вывод о том, что научная квалификация автора – Гилепа А.А. – соответствует ученой степени доктора химических наук.

10. Научный уровень диссертации

Диссертационная работа является развитием актуального научного направления биохимии, посвящена установлению закономерностей молекулярной эволюции и молекулярных механизмов функционирования стероид-гидроксилаз, включая субстратную специфичность, взаимодействие с белками партнерами, а также взаимодействие с модуляторами данных ферментативных систем, содержит новые результаты, совокупность которых является крупным достижением в области биохимии. Результаты исследования опубликованы в высокорейтинговых научных журналах и имеют высокий уровень цитирования, что свидетельствует о востребованности данных и высоком уровне полученных экспериментальных данных. Ряд полученных научных результатов являются наиболее значимыми:

- Установлено участие ферментов *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов.
- Установлено участие стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов в каталитическом превращении 5,7-диен-стероидов.

Таким образом, можно сделать вывод о высоком научном уровне диссертационной работы Гилепа А.А.

Заключение оппонента

Диссертационная работа «Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз» является завершенным самостоятельным квалификационным исследованием, соответствующим требованиям ВАК Республики Беларусь, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора химических наук. В соответствии с требованиями Главы 3 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий Гилеп Андрей Александрович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия» (химические науки) за новые научно обоснованные теоретические и экспериментальные результаты, включающие:

- создание многоцелевой стратегии получения рекомбинантных CYP17 из различных организмов (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Bison bison*, *Homo sapiens*, *Felis catus*, *Cavia porcellus*, *Equus caballus*, *Mesocricetus auratus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*), а также цитохромов P450 человека (CYP21A2, CYP19A1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9), грибов (CYP51 *Candida glabrata*, азол-резистентного штамма *Candida albicans* и *Candida krusei*), *Mycobacterium tuberculosis* (стероид-гидроксилаз), цитохромов b5 – CYP5 и NADPH-цитохром P450 редуктазы - CPR из различных организмов, мембранного рецептора прогестерона - PGMRC1 *Rattus norvegicus* в *E.coli*, что обеспечило выделение ферментов в высокоочищенном состоянии;

- установление молекулярной эволюции первичных структур CYP17 и CYP51, в том числе 7 новых клонированных ферментов, для которых ранее первичная структура была неизвестна;

- осуществление физико-химической характеристики взаимодействия производных стероидов, азол- и полифенолсодержащих ксенобиотиков (противогрибковых лекарственных препаратов и фунгицидов), а также олигонуклеотидных аптамеров с активным центром CYP51 штаммов различных микроорганизмов рода *Candida* и установление отдельных аминокислотных замен, обуславливающих развитие резистентности патогенных грибов к антибиотикам;

- создание эффективной системы реконструкции ферментативных реакций, катализируемых CYP11A1 и CYP17A1, с использованием в качестве субстратов 3 β -гидрокси-5-ен стероидов на основе проведения каталитической трансформации функционально значимых стероидов на уровне отдельных ферментов семейства стероид-гидроксилаз: 7-дегидрохолестерина и секостероидов с участием CYP11A1; 7-дегидропрегненолона с участием CYP17A1 и определения субстратной специфичности CYP11A1 в отношении секостероидов;

- обнаружение участия стероид-гидроксилаз и 3 β -стероид-дегидрогеназы *Mycobacterium tuberculosis* в катализе реакций трансформации иммуноактивных стероидов, а также 7-дегидрохолестерина и 25-гидрокси-7-дегидрохолестерина;

- определение молекулярных механизмов переноса электронов в CYP-зависимых - системах на основе установления кинетических и термодинамических параметров белок-белковых взаимодействий стероид-гидроксилаз в парах с различными редокс-партнерами из митохондриальных и микросомальных систем человека;

- установление молекулярных механизмов аллостерической регуляции в CYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах на основе термодинамических и кинетических параметров взаимодействия стероид-гидроксилаз с модуляторами (CPR и аденодоксина, CYP5 и PGRMC1).

что, в совокупности, имеет фундаментальное значение для развития биохимии стероидогенеза, в частности вносит крупный вклад в формирование теоретической и молекулярно-биологической химии стероид-гидроксилаз,

структурного анализа ферментативных систем и обеспечивает новые знания о биосинтезе и метаболизме физиологически и фармацевтически значимых соединений.

Официальный оппонент:

Минеева Ирина Владимировна,
доктор химических наук, доцент,
профессор кафедры органической химии
химического факультета

Белорусского государственного университета



И.В. Минеева

