

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.

Диссертационная работа Гилепа Андрея Александровича «Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз» посвящена актуальному вопросу современной биохимии – определению субстратной специфичности и спектра образующихся под действием стероид-гидроксилаз продуктов, выявлению ингибиторов данных фармацевтически значимых ферментов, а также проведению комплексных интерактомных исследований в области анализа белок-белковых взаимодействий.

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

По предмету исследования, кругу решаемых научных задач, применяемым методическим подходам, объектам исследования, полученным результатам, выводам и основным положениям, выносимым на защиту диссертация Гилепа А.А. полностью соответствует специальности 03.01.04 – «биохимия», разделам I, II и III Паспорта специальности, в частности, пунктам из раздела III (на основании паспорта данной специальности, утвержденного приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 23.04.2018 № 116): 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, корригирующих 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.

2. Актуальность темы диссертации.

Центральную роль в биосинтезе физиологически активных веществ (стероидов, витаминов группы D, желчных кислот и др.) и окислении ксенобиотиков играют ферментные системы с цитохромом P450 в качестве терминальной оксидазы, осуществляющей регио- и стерео селективное гидроксилирование молекул субстратов. Широкое распространение, универсальность строения и ключевая роль в биосинтезе и метаболизме

позволяют использовать эти системы для изучения ряда фундаментальных проблем современной биохимии, таких как: регуляция биосинтеза физиологически активных веществ на тканевом, субклеточном и молекулярном уровнях; принципы функционирования «многоцентровых» ферментов и систем, осуществляющих согласованные процессы электронного транспорта, взаимодействия с субстратами и активации молекулярного кислорода; структурно-функциональные аспекты белок-белкового и белок-лигандного узнавания; молекулярные механизмы филогенетического разнообразия путей биосинтеза и метаболизма. Функции стероидов зависят от степени их модификации. Одна из ключевых групп ферментов, участвующих в модификации стероидов, – стероид-гидроксилазы. Эта группа ферментов широко представлена во всех царствах живых организмов. Нарушения работы этих ферментов в организме человека могут привести к тяжелым наследственным заболеваниям. Кроме того, многие из этих ферментов являются потенциальными мишенями для воздействия лекарственных соединений. Известно, что регио- и энантиоселективное гидроксилирование стероидов позволяет получать фармацевтические препараты, которые имеют широкое терапевтическое применение в качестве контрацептивов, противовоспалительных, иммунодепрессивных, анаболических и диуретических средств. При этом, важным вопросом является определение субстратной специфичности и спектра образующихся под действием стероид-гидроксилаз продуктов, выявление ингибиторов данных фармацевтически значимых ферментов, а также установление закономерностей белок-белковых взаимодействий при их функционировании.

В этой связи, важно отметить, что многие вопросы по исследованию закономерностей образования стероид-гидроксилаз, их функционирования и их белок-белковых взаимодействий до настоящего времени оставались неизученными.

Поэтому, решение научных задач, поставленных в диссертационной работе *Гилена Андрея Александровича*, посвященной закономерностям функционирования стероид-гидроксилаз, является весьма актуальным и имеет высокую научную и практическую значимость.

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

Основные научные результаты диссертации и положения, выносимые на защиту, являются новыми и получены впервые.

Автором впервые показаны особенности молекулярной эволюции ферментов CYP17 и CYP51.

Обнаружено участие монооксигеназ *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов.

Показан вклад 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.

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

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

Достоверность полученных результатов, обоснованность научных положений и выводов диссертации обеспечена использованием современных методов молекулярной биологии, химии и биохимических исследований, методов математического моделирования. Сделанные выводы вытекают из основного содержания диссертации, аргументированы и соответствуют цели и задачам работы.

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

Результаты рецензируемой работы имеют несомненную как научную, так и практическую значимость.

Диссертационная работа Гилепа А.А. приносит новые знания о процессах и механизмах функционирования стероид-гидроксилаз, включая субстратную специфичность, взаимодействие с белками партнерами, а также взаимодействие с модуляторами данных ферментативных систем; и имеет существенную научную значимость.

Практическая значимость диссертационного исследования заключается в разработке на основе стероид-гидроксилаз человека фармацевтически значимых ферментов с целью создания новых терапевтических средств, а также разработке комплексных систем диагностики и терапии заболеваний, ассоциированных со стероид-гидроксилазами.

Результаты работы внедрены в клиническую практику. Подготовлены инструкции по применению, утвержденные МЗ РБ: «Метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9: инструкция по применению № 097-1117» и «Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов: инструкция по применению № 008-1119».

6. Опубликованность результатов диссертации в научной печати.

Основные научные результаты и положения диссертации достаточно полно представлены и обсуждены в научной печати. Основные результаты диссертационной работы Гилепа А.А. представлены в 39 работах, в том числе 26 статьях в научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении учёных степеней и присвоении учёных званий в Республике Беларусь, 1 статье в сборниках научных трудов и тезисах 10 докладов. Общий объем опубликованных материалов составляет 32,98 авторских листов.

7. Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Беларуси. Работа состоит из перечня условных обозначений, введения, общей характеристики работы, основной части, в которой представлены аналитический обзор литературы (глава 1), описание материалов и методов исследования (глава 2), основные результаты исследований (глава 3), заключение; список использованных источников. Полный объем диссертации составляет 191 страницу, содержит 21 рисунок, 22 таблицы и 6 приложений. Список использованных источников состоит из библиографического списка из 237 наименований, включая 39 работ соискателя.

В диссертации соискатель ученой степени приводит ссылки с указанием авторов и источников, материалы которых он использует. Ссылки приводятся также и на собственные публикации, в которых содержатся материалы, излагаемые в диссертации. При использовании в диссертации результатов, принадлежащих лицам, совместно с которыми были написаны научные работы, а также иным лицам, автор ссылается на них и отмечает это в диссертации и автореферате ссылкой на источник.

Обзор литературы (1-я глава) представляет данные о классификации, структуре и функции стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов. Описана роль редокс-партнеров и регуляторов в работе стероид-гидроксилаз. В конце главы поставлены вопросы по данной проблеме и обозначены задачи исследования.

В главе 2 представлены самые современные методы исследования, включая молекулярно-биологические методы для конструирования экспрессионных векторов и молекулярного клонирования стероид-гидроксилаз и белков партнеров, методы наработки, выделения и очистки рекомбинантных белков. Описаны методы анализа физико-химических, лиганд-связывающих и каталитических свойств полученных рекомбинантных белков. В работе использованы как методы, описанные в литературе, так и подходы, разработанные в процессе выполнения работы.

В главе 3 (результаты и обсуждение) представлены результаты исследований молекулярной организации и новых биохимических функций стероид-гидроксилаз и их обсуждение. В разделе 3.1 представлена молекулярная эволюция и субстратная специфичность CYP17, в разделе 3.2 изучено участие стероид-гидроксилаз млекопитающих в метаболизме 5,7-диен стероидов и секостероидов, в разделе 3.3 показана молекулярная эволюция и лигандсвязывающие характеристики CYP51, в разделе 3.4 изучены механизмы взаимодействия стероид-гидроксилаз с белками-партнерами, в разделе 3.5 установлены закономерности взаимодействия стероид-гидроксилаз с аллостерическими белковыми регуляторами, в разделе 3.6 показано участие стероид-гидроксилаз и стероид-дегидрогеназ *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов. Одновременно, во всех разделах приведено обсуждение полученных результатов, направленных на анализ молекулярной организации и функции стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов.

В заключении автор подытоживает полученные данные и делает соответствующие логические выводы. Полученные данные прекрасно обсуждены с привлечением 237 отечественных и зарубежных источников.

В целом, работа очень хорошо оформлена, написана четким и ясным языком, практически не содержит опечаток. Изложение экспериментальных результатов выстроено в логической последовательности, все обсуждаемые положения и выводы хорошо проиллюстрированы 21 рисунком и 22 таблицами. Автореферат диссертации отражает суть работы, ее результаты и основные положения, которые автор выносит на защиту.

Таким образом считаю, что диссертация Гилепа Андрея Александровича «Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз» является законченным научным трудом и по актуальности темы,

объему и значимости полученных результатов отвечает требованиям ВАК Беларуси, предъявляемым к докторским диссертациям.

8. Замечания по диссертации.

Однако, при анализе результатов у меня возникли следующие вопросы и замечания:

- Таблицы 2.2 – 2.6 – нет статистических данных (разбросов).
- Нет раздела «Статистический анализ данных» в главе «Материалы и методы». Не указаны методы статистического анализа.
- Таблица 3.1 - нет статистических данных (разбросов).
- Достаточен ли вывод об уровне нативности фермента только лишь по СО-спектру с максимумом 450 нм?
- Насколько степень очистки фермента влияет на уровень его нативности?
- За счет каких особенностей структуры CYB5 *Rattus norvegicus* может отличаться от CYB5 *Xenopus laevis*?

Высказанные вопросы и замечания, однако, не влияют на сделанные автором выводы и положения, выносимые на защиту, и могут быть сняты в процессе дискуссии.

9. Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени доктора наук

Полученные результаты отражены в публикациях, включая публикации в высокорейтинговых научных журналах. При решении научных задач используется широкий круг комплиментарных методических подходов. Полученные результаты обсуждаются с использованием самых современных научных данных. Выводы и гипотезы научно обоснованы.

Таким образом, не вызывает сомнений высокая научная квалификация соискателя ученой степени доктора наук.

Заключение оппонента

Автор работы кандидат химических наук Гилеп А.А. является квалифицированным специалистом в области биохимии. 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

- результаты, расширяющие и углубляющие современные представления о процессах и механизмах функционирования стероид-гидроксилаз, а именно:
- установление особенностей молекулярной эволюции ферментов CYP17 и CYP51;
 - обнаружение участия монооксигеназ *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов;
 - установление вклада стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов на уровне изолированных ферментов в каталитическом превращении 5,7-диен-стероидов;
 - установление кинетических и термодинамических параметров взаимодействия стероид-гидроксилаз с белками партнерами;
 - обнаружение потенциальных модуляторов активности стероид-гидроксилаз из числа производных стероидов, азолов и полифенолов, а также олигонуклеотидных аптамеров.

Результаты диссертационной работы внедрены в клиническую практику здравоохранения Беларуси (получены 2 инструкции по применению, утвержденные МЗ РБ).

Отзыв может быть опубликован в открытой печати и размещен в интернете.

Официальный оппонент:

Заведующий научно-исследовательским отделом
медицинских биотехнологий ГНУ «Институт биофизики
и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
доктор биологических наук, профессор

Д.Г. Щербин

