

УТВЕРЖДАЮ

Директор государственного
научного учреждения «Институт
физико-органической химии
Национальной академии наук
Беларуси»

А.В. Бильдюкевич
« 05 » 2025 г.

ОТЗЫВ

оппонирующей организации

по результатам экспертизы диссертационного исследования

ГИЛЕПА Андрея Александровича

на тему «Молекулярная организация и новые биохимические функции
стероид-гидроксилаз», представленной на соискание ученой степени

доктора химических наук

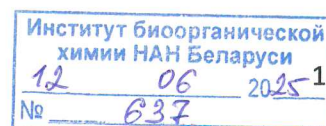
по специальности 03.01.04 – биохимия

**Соответствие содержания диссертации заявленной специальности
и отрасли науки со ссылкой на область исследования паспорта
соответствующей специальности, утвержденного ВАК**

По своему содержанию, степени новизны положений, выносимых на защиту, полученным результатам, методике проведенного исследования, диссертация Гилепа Андрея Александровича соответствует отрасли «Химические науки», п.п. 1, 3, 4, 11, 15 паспорта специальности 03.01.04 – биохимия, утвержденного приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 23 апреля 2018 г. № 116. В частности, пункты паспорта специальности 03.01.04 (биохимия) включают:

- Вопросы строения, свойств, образования, метаболизма и функциональной активности аминокислот, пептидов, белков, нуклеиновых кислот и их компонентов;

- 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;



- Термодинамические, квантово-механические и кинетические расчеты на уровне функционирования отдельных молекул, компьютерное моделирование пространственной структуры биополимеров и надмолекулярных комплексов. Молекулярную динамику и докинг;

- Разработку биохимических методов исследования живых систем и способов получения веществ, корригирующих нарушение обменных процессов в организме;

- 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.

Научный вклад соискателя в разработку научной проблемы с оценкой его значимости

Научный вклад соискателя состоит в установлении особенностей молекулярной эволюции генных семейств цитохромов CYP17 и CYP51. Впервые проведено молекулярное клонирование 7 новых природных CYP17 из организмов, для которых ранее последовательность CYP17 была неизвестна. Получены высокоочищенные рекомбинантные препараты и проведена сравнительная характеристика ферментативных особенностей для 5 новых CYP17 и 7 известных на момент начала исследования CYP17, что важно для понимания патогенеза онкологических и эндокринных заболеваний и разработки новых систем диагностики.

Соискателем проведен анализ молекулярной эволюции CYP51 в ряду прокариот и эукариот. Экспериментально установлены мутации резистентных к действию противогрибковых препаратов азолового ряда CYP51 штаммов (изолятов клинического материала ряда белорусских клиник).

Также проведен анализ взаимодействия противогрибковых соединений азолового ряда с активным центром CYP51 (азол-резистентного штамма).

Разработан и внедрен в клиническую практику алгоритм установления таксономической принадлежности патогенных штаммов грибов с применением комплексных методов клинической лабораторной диагностики, получены новые данные каталитического превращения 5,7-диен стероидов отдельными ферментами.

Впервые установлено участие монооксигеназ в метаболизме иммуноактивных стероидов.

Полученные результаты способствуют пониманию молекулярных механизмов подавления иммунитета человека клетками микобактерий

и являются заделом для дальнейшего поиска уникальных и специфических функций ферментов семейства цитохромов P450.

Показано, что белки группы PGRMC относятся к гемопротеинам, установлены молекулярные основы действия CYP5 и PGRMC на стероид-гидроксилазы.

Основные положения и выводы диссертации основываются на экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов исследования: электрофоретическом анализе белков и нуклеиновых кислот, электронной спектроскопии, различных видах колоночной хроматографии, ВЭЖХ, масс-спектрометрии, ЯМР-анализе.

Содержание диссертационного исследования, а также публикации автора свидетельствуют, что Гилеп А. А. внес существенный вклад в понимание систем биосинтеза и метаболизма стероидов у животных и патогенных микроорганизмов.

Конкретные научные результаты (с указанием их новизны и практической значимости) за которые соискателю может быть присуждена искомая ученая степень

Научные результаты диссертации изложены последовательно, логично, с использованием современных представлений о биосинтезе и метаболизме стероидов. Соискателю Гилепу А. А. может быть присуждена ученая степень доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия за новые научные результаты проведенных исследований в области биосинтеза и метаболизма стероидов у животных и патогенных микроорганизмов, включающие:

- установление субстратной специфичности стероид-гидроксилаз млекопитающих;
- выявление участия CYP17 в активации прокарциногенов;
- установление каталитического превращения 5,7 диен стероидов отдельными ферментами;
- анализ молекулярной эволюции CYP51 в ряду прокариот и эукариот;
- анализ взаимодействия противогрибковых соединений азолового ряда с активным центром CYP51;
- идентификацию соединений, которые селективно связываются с CYP51 патогенных грибов;
- установление факта специфического взаимодействия сконструированных олигонуклеотидных аптамеров и лютеолин дисульфата с поверхностью стероид-гидроксилаз;

- получение высокоочищенных препаратов из компонентов CYP-зависимых стероид-гидроксилазных систем человека и установление молекулярных основ межмолекулярных взаимодействий стероид-гидроксилаз с редокс-белками;

Практическая значимость результатов исследования заключается в том, что полученные препараты стероид-гидроксилаз человека и патогенных микроорганизмов могут быть использованы при проведении комплексного структурно-функционального анализа фармацевтически значимых ферментов с целью создания новых терапевтических средств, а также разработки комплексных систем диагностики и терапии заболеваний, ассоциированных со стероид-гидроксилазами.

Разработанный метод и утвержденные Министерством здравоохранения РБ инструкции по его применению используется врачами для выбора необходимого лекарственного средства и назначения его правильной дозировки.

Разработанный в ходе выполнения исследований алгоритм установления таксономической принадлежности патогенных штаммов грибов внедрен в клиническую практику при лечении пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Практическая значимость результатов диссертации подтверждена:

1) *Учебно-методическим изданием*

Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования у пациентов с психическими и поведенческими расстройствами при назначении психотропных лекарственных средств; учеб.-метод. пособие / Т.В. Докукина, А.А. Гилеп, А.И. Старцев, Т.С. Голубева, М.В. Махров, И.В. Гайдукевич, С.А. Марчук, Е.А. Шеремет, А.С. Пинчук, А.В. Роменский, К.С. Жаранков. – Минск: Мисанта, 2016. – 56 с.

2) *Инструкциями по применению*

Метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9: инструкция по применению № 097-1117: утв. М-вом здравоохранения Респ.Беларусь 01.12.2017 г. / сост Т.В. Докукина, А.А. Гилеп, Т.С. Голубева, М.В. Махров, И.В. Гайдукевич, С.А. Марчук, Е.А. Шеремет. – Минск: РНПЦ психического здоровья, 2017. – 10 с.

Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов: инструкция по применению № 008-1119: утв. М-вом здравоохранения Респ.Беларусь 20.12. 2019 г. / сост. С.А. Усанов, А.А. Гилеп, М.В.

Белевцев, Т.В. Шкель, Т.Е. Секацкая, Т.Т. Кульбицкая, С.Л. Кондаурова, Т.В. Райко, Е.Я. Скоповец. – Минск: Институт биоорганической химии НАН Беларуси; РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, 2019. – 17 с.

3) *Научно-технической документацией*

Опытно- промышленный регламент № ОПП-04/2021 на производство препарата ферментного «Рекомбинантный цитохром CYP51 грибов» /А.А. Гилеп, Н.П. Башко, Т.В. Шкель, И.П. Грабовец // Институт биоорганической химии НАН Беларуси – Минск, 2021. – 31с.

Лабораторный технологический регламент на изготовление ферментного препарата цитохрома P450 2C9 (изоморфы *1, *2, *3) человека и методические рекомендации по определению взаимодействия данных ферментов с ингибиторами №6/2015/А.А. Гилеп, И.В. Гайдукевич, С.А. Усанов// Институт биоорганической химии НАН Беларуси – Минск, 2015. – 21с.

Замечания по диссертации

1. Среди известных ингибиторов CYP51 упоминаются производные азолов в том числе триазолов. Обладают ли производные других азот-содержащих гетероциклов (тетразолы, изоксазолы и другие) потенциальным ингибирующим действием на CYP51 и другие стероид-гидроксилазы?

2. В диссертационной работе в качестве потенциальных лигандов используются различные классы органических соединений. Однако отсутствует описание принципов на основании которых выбраны именно данные классы соединений, а не другие?

3. В диссертационной работе представлена информация о белок-белковом взаимодействии стероид-гидроксилаз млекопитающих. Проводились ли исследования белок-белкового взаимодействия стероид-гидроксилаз патогенных микроорганизмов?

4. Можно ли на основании полученных данных о взаимодействии различных соединений с активным центром стероид-гидроксилаз построить фармакофорную модель активного центра этих ферментов?

Высказанные замечания носят дискуссионный характер и не подвергают сомнению достоверность полученных автором результатов исследования, актуальность научной новизны и выводы диссертации.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Ученая степень доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия может быть присуждена Гилепу А. А. за совокупность новых научно обоснованных, экспериментальных и теоретических результатов включающих:

- создание многоцелевой стратегии получения рекомбинантных СУР17 из различных организмов;
- установление молекулярной эволюции первичных структур СУР17 и СУР51, в том числе 7 новых клонированных ферментов, для которых ранее последовательность аминокислот 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 СУР51 штаммов различных микроорганизмов;
- создание эффективной системы реконструкции ферментативных реакций, катализируемых СУР11А1 и СУР17А1;
- определение молекулярных механизмов переноса электронов в СУР-зависимых стероид-гидроксилазных системах;
- установление молекулярных механизмов аллостерической регуляции в СУР-зависимых стероид-гидроксилазных системах.

Доклад Гилепа Андрея Александровича и проект отзыва оппонировавшей организации, подготовленный экспертом, заслушаны и обсуждены в соответствии с приказом директора №13-а от 27.05.2025 на объединенном научном семинаре лаборатории химии биоконъюгатов, лаборатории химии гетероциклических соединений и отдела лекарственных веществ государственного научного учреждения «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», состоявшемся 04.06.2025 г., протокол № 2.

Проведено открытое голосование по утверждению отзыва. На заседании научного собрания присутствовало 38 человек, из них 3 доктора химических наук (Куваева З.И., Бильдюкевич А.В., Плиско Т.В.), 19 кандидатов химических наук (Бекиш А.В., Ронишенко Б.В., Шманай В.В., Шарко О.Л., Бекиш Ю.Н., Каранкевич Е.Г., Шаченкова Л.Н., Глевицкая Т.А., Терешко А.Б., Филиппович Л.Н., Колесник И.А., Дикусар Е.А., Бурть Е.С., Бабенко А.С., Праценко С.А., Невар Т.Н., Лысенко И.Л., Орёл А.С., Ковальская С.С.), 1

кандидат технических наук (Латышевич И.А.). В голосовании приняли участие сотрудники, имеющие ученую степень. Итоги голосования: «за» – 23, «против» – 00, «воздержался» – 00.

Эксперт,
зав. отделом лекарственных веществ
д.х.н.

Куваева З.И.

Председатель научного собрания
в.н.с. лаборатории химии
биоконъюгатов, к.х.н.

Шарко О.Л.

Секретарь научного собрания
с.н.с. лаборатории химии
биоконъюгатов, к.х.н.

Бекиш Ю.Н.