

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Гилеп Андрея Александровича
«Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которой она представлена к защите

Диссертация Гилепа А.А. соответствует специальности 03.01.04 – биохимия, так как данное исследование посвящено комплексному анализу молекулярной организации и функций стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов. Диссертация выполнена в рамках отрасли «химические науки», поскольку объект (стероид-гидроксилазы, представленные во всех царствах живых организмов) и предмет (субстратная специфичность и спектр образующихся под действием стероид-гидроксилаз продуктов, включая выявление важных в фармацевтике ингибиторов, интерактомные исследования в анализе белок-белковых взаимодействий) соответствуют этой отрасли науки. Работа выполнялась на протяжении более 15 лет в рамках приоритетных Программ научных исследований в виде 8 этапов с номерами государственной регистрации.

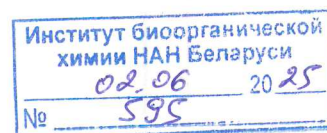
Актуальность темы диссертации

1. Работа посвящена решению актуальной проблемы – установлению закономерности молекулярной эволюции и молекулярных механизмов функционирования стероид-гидроксилаз на основе оценки субстратной специфичности, взаимодействия с белками-партнерами и модуляторами этих ферментативных систем.
2. Требуется дополнительные доказательства участия стероид-гидроксилаз в каталитическом превращении секостероидов и превращении 5,7-диен-стероидов.
3. В практическом отношении актуально изучение взаимодействия стероид-гидроксилаз с производными стероидов, азолов, полифенолов, олигонуклеотидными аптамерами для отбора высокоспецифичных ингибиторов.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, которые выносятся на защиту

Новыми являются следующие результаты диссертационного исследования:

1. Установлена субстратная специфичность и молекулярная эволюция CYP17 в отношении стероид-17,20-лиазной реакции и участие в активации прокарциногенов, например, афлатоксина В₁.
2. Установлено участие стероид-гидроксилаз млекопитающих в каталитическом превращении 5,7-диен-стероидов.



3. Проведено молекулярное клонирование 7 новых природных CYP17 из организмов, для которых последовательность CYP17 неизвестна. Различия первичной структуры внутри одного семейства затрагивают лишь аминокислотные остатки, которые располагаются на поверхности белка.

4. Представлены результаты о каталитической активности высокоочищенных CYP17 12 организмов, включая человека.

5. Проведен глубокий анализ метаболизма 5,7-диен стероидов и производных витамина D показавший, что CYP11A1 участвует в каталитическом превращении 7-дегидрохолестерина и витамина D₃.

6. Комплексный биоинформационный анализ последовательностей гена *CYP51* грибов вида *C. albicans* показал наличие мутаций, связанных с развитием резистентности к противогрибковым субстанциям. В связи с этим разработан алгоритм для быстрого определения видовой принадлежности дрожжевых и мицелиальных и патогенных грибов с использованием микробиологических, молекулярно-биологических и масс-спектрометрических исследований.

7. Осуществлен синтез и анализ олигонуклеотидов, связывающих CYP11A1 человека и показано, что олигонуклеотиды, специфичные в отношении области связывания CYP с редокс-партнерами, могут быть использованы для модуляции белок-белковых взаимодействий в CYP-зависимых системах.

8. Представлен новый взгляд на белок-белковые взаимодействия CYP-зависимых митохондриальной и микросомальной монооксигеназных систем, что связано со специализацией и универсальностью белок-белковых взаимодействий.

9. Впервые показано, что гомолог мембран-связанной формы CYP5 – PGMRC1 был впервые идентифицирован в микросомальной фракции коры надпочечников и может модулировать функционирование CYP-зависимых систем.

10. Подтверждена взаимосвязь генетического полиморфизма CYP2C9 с эффективностью метаболизма лекарственных средств, что важно для лабораторной диагностики и психиатрии.

11. Обосновано предположение, что *M. tuberculosis* имеет свою систему трансформации, являющуюся функциональным аналогом системы метаболизма ксенобиотиков I фазы человека и животных, что может лежать в основе вирулентности микобактерии.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций определяется следующими позициями:

- достаточным для анализа количеством фактического материала;
- хорошим современным уровнем проведенных биохимических, инструментальных и биоинформационных исследований;
- обоснованной статистической обработкой цифрового материала.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость

Теоретическая (фундаментальная) значимость работы определяется установлением многоплановых закономерностей молекулярной эволюции и молекулярных механизмов функционирования стероид-гидроксилаз в норме и при патологии.

Практическая значимость работы определяется предложениями автора диссертации по дополнению панелей биохимического обследования больных на уровне белок-белковых взаимодействий в СYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах, оценке толерантности микобактерий к действию системы иммунитета человека и разработке инновационных терапевтических подходов к лечению пациентов.

Социальная значимость работы вытекает из создания авторитетной системы взаимодействия ученых на международном уровне и в рамках Союзного государства по исследованию теоретических и практических задач, определяющих функционирование стероид-гидроксилазных систем.

Экономическая значимость будет связана с обоснованием лабораторных технологий, позволяющих исследовать причины нарушений стероид-гидроксилазных систем и целенаправленного синтеза необходимых лекарственных средств.

Опубликованность результатов в научной печати

По теме диссертации опубликовано 39 печатных работ из них 28 авторитетных международных журналов в журналах, а также включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Соответствие оформления автореферата требованиям ВАК

Автореферат диссертации Гилеп А.А. оформлен согласно действующей Инструкции по оформлению диссертации и автореферата. Работа содержит новые научные результаты и четко сформулированные положения, выдвигаемые автором для публичной защиты. Данная работа имеет внутреннее единство и свидетельствует о личном вкладе автора в науку. Цель работы и 7 задач сформулированы четко. Этим задачам соответствуют 7 емких выводов и практические рекомендации. На публичную защиту вынесены 6 аргументированных положений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Гилеп Андрея Александровича «Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз», представленная к защите на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 — биохимия, соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к докторским диссертациям и является завершенным научным исследованием,

содержащим новые данные о молекулярной эволюции и установление молекулярных механизмов работы стероид-гидроксилаз, включая субстратную специфичность, взаимодействия с белками-партнерами и модуляторами этих ферментативных систем. Ученая степень доктор химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия может быть присуждена Гилеп А.А. за демонстрацию каталитического превращения 5,7-диен-стероидов на уровне ферментов млекопитающих – CYP11A1 и CYP17, установление молекулярной эволюции CYP17 и CYP51, открытие взаимосвязи структуры CYP51 для патогенных грибов из-за развития резистентности к антимикотикам азолового ряда, открытие ингибиторов стероид-гидроксилаз, открытие способности ряда микросомальных стероид-гидроксилаз поддерживать катализ с использованием митохондриальных редокс-партнеров CYP, установление взаимосвязи полиморфизма CYP2C9 с клиническим эффектом CYP5 и доказательство участия стероид-гидроксилаз и 3 β -стероид-дегидрогеназы микобактерии туберкулеза в метаболизме иммуноактивных стероидов.

Профессор кафедры химии и естественнонаучного образования
Витебского государственного университета им. П.М.Машерова,
Лауреат Государственной премии БССР
д.б.н., профессор

Чиркин А.А.

30 мая 2025 г.



Подпись удостоверяю
Катальник отдела кадров
Е.П. Соловьёва

ОТЗЫВ

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

Стероид-гидроксилазы являются важным компонентом различных регуляторных систем в связи с тем, что могут модифицировать стероиды на разную глубину, придавая им свойства важнейших сигнальных соединений, включая гормональную. Получение информации о молекулярной организации и функциональных свойств стероид-гидроксилаз способствует пониманию ключевых процессов в организмах высших животных. С другой стороны, изучение стероид-гликозидаз патогенных грибов позволяет находить эффективные ингибиторы этих ферментов, весьма важных для функционирования этих микроорганизмов. Таким образом актуальность работы не вызывает каких-либо сомнений.

Ключевым результатом, определившим успех всей остальной работы, явилась разработка способов получения в препаративных количествах рекомбинантных белковых компонентов стероид-гидроксилаз человека, животных и патогенных микроорганизмов, ответственных за 17 α -гидроксилирование и 17,20-лиазную реакцию. Были показаны различия в активности ферментов, которые могут вызывать, обе реакции сразу, либо только одну из двух. Это определяет разные направления биосинтеза стероидных гормонов. Выполнено сравнение аминокислотных последовательностей у этих ферментов, продуценты которых стоят далеко друг от друга таксономически и показано, что эволюционные изменения в последовательностях могут приводить к разным путям биосинтеза гормонов. Также были установлены пути каталитических превращений 5(6),7(8)-ненасыщенных стероидов, включая превращения, катализируемые при участии цитохрома CYP11A1. Были изучены изоляты патогенных грибов, из которых получены образцы CYP51 для которых выяснено, какие мутации и как влияют на их устойчивость к действию антигрибковых препаратов азолового типа. Были выявлены эффективные ингибиторы CYP51 среди специально синтезированных стероидных препаратов, олигонуклеотидных аптамеров и лютеонин-7,3'-дисульфата. Были установлены молекулярные основы взаимодействия стероид-гидроксилазных систем человека с редокс-белками, что в совокупности с другими данными позволило определить молекулярные механизмы переноса электронов и оценить специфичность белок-белок взаимодействий в этих системах. Соискатель показал участие стероид-гидроксилаз и 3 β -гидроксистероид-дегидрогеназы из *Micobacterium tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов.

Полученные результаты имеют важное фундаментально-теоретическое значение, раскрывая механизмы стероидного метаболизма как у высших животных, так и у патогенных микроорганизмов, что позволит лучше понимать ход различных заболеваний, связанных с нарушениями стероидного метаболизма или, наоборот, вызывать такие нарушения у патогенов, создавать диагностикумы и т.д.

Работа имеет небольшие стилистические недостатки. Так, на стр. 5 появляется цитохром CYP11A1, но нигде далее не расшифровывается что это за фермент или компонент ферментной системы, и откуда он вообще взялся. Автор часто употребляет выражение типа «установлено вещество» вместо «установлена структура вещества», не всегда латинские названия живых организмов выделены курсивом. Тяжелое впечатление производит использование полного ГОСТа для оформления списка опубликованной по теме литературы. В случае авторефератов предписывается использовать упрощенную версию ГОСТа для подстрочных примечаний, который вполне соответствует обычным способам оформления списков литературы и который существенно легче для восприятия читателем. Естественно, что эти мелкие недостатки не умаляют ценности этой работы.

Диссертационное исследование выполнено на высоком современном методическом уровне. Результаты обоснованы экспериментально и опубликованы в 28 статьях в ведущих научных журналах по тематике. Работа представляет собой крупный вклад в области исследования метаболизма стероидов, причем является актуальной не только для медиков и исследователей стероидного метаболизма высших животных и патогенных грибов, но также интересной и для работающих в области изучения метаболизма изопреноидов морских беспозвоночных. По объему экспериментальной деятельности, глубине обобщений, теоретической и практической значимости результатов работа вполне соответствует требованиям, предъявляемым на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Ведущий научный сотрудник
ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток,
690022, Российская Федерация

д.б.н.

Калинин В.И.

Подпись д.б.н. Калинина Владимира Ивановича

Заверяю
Ученый секретарь ТИБОХ ДВО РАН
К.х.н.

Борисова К.Л.

4.06.2025

