

ОТЗЫВ официального оппонента

**на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Алешина Василия Алексеевича
на тему: «Идентификация белков-мишеней и изучение механизмов
действия тиамин, его производных и антагонистов для направленной
регуляции метаболизма млекопитающих»
по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»**

Тиамин является важной молекулой для организма. Попадание этого витамина в организм человека почти полностью зависит от поступления с пищей, поскольку отсутствует путь его эндогенного синтеза, хотя некоторые формы бактерий в кишечнике могут продуцировать небольшое (но не достаточное для организма) количество тиамин. Тиамин был первым выделенным в очищенном состоянии в начале прошлого века витамином, и с тех пор он интенсивно изучался. Были получены обширные сведения о крупных ферментных комплексах, в составе которых производные тиамин функционируют в качестве кофермента. Однако в последние годы ученые неоднократно получали экспериментальные свидетельства наличия разнообразных мишеней тиамин, по отношению к которым он проявлял новые эффекты. Поскольку тиамин играет ключевую роль в организме, исследование некоферментных механизмов метаболической регуляции тиамином, природными производными и антагонистами тиамин представляет актуальную задачу не только для биоинженерии метаболизма, но и для биохимии, а возможно, и для медицины в целом.

Научная новизна работы заключается в получении пионерских данных о взаимодействии природных производных и структурных аналогов тиамин с пиридоксалькиназой и о их действии по некоферментному типу на активность, регуляторные свойства и посттрансляционные модификации ключевых ферментов организма. Большую важность представляет открытая

суточная регуляция трех ключевых ферментов мозга и ее изменение при введении тиамин. Показано сопряжение некоферментного и коферментного типов тиаминовой регуляции путем воздействия на посттрансляционные модификации и на транскрипцию генов, зависящих от р53.

Получение приоритетных данных было достигнуто с использованием передовых методов биоинженерии, биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии, кристаллографии, а также биоинформатического анализа. Достоверность результатов подтверждается использованием статистических методов обработки экспериментальных данных. Результаты исследования могут послужить основой для **практического использования** при создании новых средств для метаболической регуляции и защиты нервной ткани.

Теоретическая значимость работы состоит в обнаружении новых механизмов регуляции метаболических процессов. Автор проделал большую работу по изучению суточной регуляции активности ферментов и установил зависимость от времени суток регуляции активности пиридоксалькиназы тиамин, а также обнаружил фосфорилирование этого фермента как возможный механизм влияния тиамин. Интересные результаты получены *in vivo* при исследовании активности пируватдегидрогеназного комплекса в зависимости от введения тиамин, который снимает фосфорилирование и восстанавливает скорость образования ацетил-КоА и снабжения им цикла трикарбоновых кислот. Нужно отметить способность В.А. Алешина анализировать огромное количество экспериментальных результатов - это дало возможность сделать ценное заключение о разнонаправленном влиянии тиамин на ацетилирование глутаматдегидрогеназы в утренние и вечерние часы. Можно сделать заключение, что в диссертации Алешин В.А. были решены несколько научных задач, имеющих значение для развития биотехнологии.

Следует высказать некоторые замечания по диссертационной работе. Довольно туманным представляется вывод о наличии минимум двух DING

белков в элюатах с тиамин-сефарозы на основании данных табл. 10. Профили элюции могут быть обусловлены не только характером связывания белка с носителем и природой определенного элюента, но и, например, зарядом молекулы, который не является показателем ферментативной активности. Результаты экспериментов об обнаружении ортолога фосфат-связывающего белка НРВР среди связавшихся на колонке, а также среди белков, не связавшихся с аффинным носителем не поддерживают дальнейших рассуждений о том, что поскольку для НРВР показана фосфатазная активность, можно рассматривать НРВР как потенциальный участник метаболизма тиамина.

При обсуждении ингибирования пиридоксалькиназы (рис.8) было бы полезно сообщить кинетические характеристики реакции в отсутствие ингибиторов. Обычно K_m лежат в области 0,01-1,0 мМ, и при исследовании ингибирования ПЛК тиамин и его аналогами (рис. 8а) не следовало бы использовать концентрации ингибитора выше 10 мМ. В экспериментах по ингибированию используются весьма высокие концентрации пиридоксала (0,1 мМ). Полагаю, что было бы полезным при обсуждении результатов по ингибированию представить литературные данные (хотя бы приблизительные) о содержании этого кофермента, а также тиамина в тканях.

В подписи к рис.11 неудачная формулировка «активность ПДК при насыщении субстратов» - вместо «при насыщении субстратами».

Не все сокращения внесены в список. Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, хорошо обоснованы и полностью подтверждены приведенными экспериментальными результатами.

Основные результаты диссертации опубликованы в научной печати. Так, по теме диссертации опубликовано 18 статей в международных журналах, индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Диссертационная работа изложена на 118 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, разделов «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 204 источника. Диссертация хорошо иллюстрирована 28 рисунками и 15 таблицами.

Обзор литературы информативен, но не перегружен, читается с интересом. В нем подробно рассмотрены природные производные тиамин и их превращения в организме, обсуждены вопросы метаболизма тиамин у млекопитающих, а также пути их клеточного транспорта. Описаны синтетические производные и антагонисты тиамин приведены их формулы, что облегчает восприятие раздела «Результаты и их обсуждение». Лаконично описана коферментная функция ТДФ, который играет ключевую роль в энергетическом обмене, принимая участие в работе важнейших мультиферментных комплексов декарбоксилирования кето-кислот. Кроме того, ТДФ является коферментом цитозольной транскетолазы в пентозофосфатном пути и 2-гидроксиацил-КоА-лиазы, пероксисомального фермента, участвующего в α -окислении фитановой кислоты. Завершает обзор раздел, посвященный медицинскому значению тиамин и его производных. Таким образом, в обзоре содержится вся информация, необходимая для понимания целей работы и диссертации в целом.

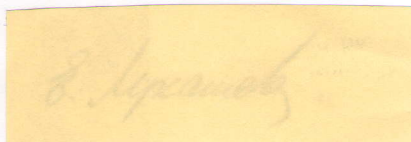
Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08 – "Биоинженерия" по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также

оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Алешин Василий Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – "Биоинженерия".

Официальный оппонент:

Лукашева Елена Васильевна



Дата 04.05.2022

Контактные данные:

тел.: +7(495)-434-51-31, e-mail: lukasheva-ev@rudn.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 03.00.04 – «Биохимия»

Адрес места работы:

117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8,

ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов (РУДН),

Медицинский институт,

профессор кафедры биохимии им. академика Т.Т.Березова

Подпись Лукашевой Е.В. удостоверен

Ученый Секретарь медицинского ин

Максимова

РУДН

Дата

