

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

Диссертационная работа, представленная В.А. Алешиным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена исследованию одного из витаминов группы В – тиамина (витамина В1) – высокоактивного природного соединения, производное которого (его дифосфорилированная форма кофермент тиаминдинофосфат (ТДФ)) является эффективным стимулятором окислительного метаболизма глюкозы. Как биологическое соединение тиамин достаточно хорошо исследован, однако накоплен также и значительный массив данных, указывающих на существование иных, отличных от ТДФ-зависимых ферментов, мишеней действия тиамина и его производных. Механизм такого действия исследован фрагментарно, в то время как некоферментная функция тиамина и некоферментные производные тиамина описаны у представителей всех царств живых организмов. Таким образом, предпринятое в работе дальнейшее изучение механизмов действия тиамина, его производных и антагонистов, представляется вполне актуальным и обоснованным как для развития фундаментальной биологии, так и для решения практических задач биоинженерии и медицины.

Основная цель работы, как ее формулирует автор, заключалась в молекулярной характеристике некоферментных механизмов метаболической регуляции тиамином с учетом метаболизма природных производных и антагонистов тиамина у млекопитающих. Для достижения этой цели в работе были сформулированы четыре взаимосвязанные задачи, которые были успешно решены в ходе исследования с использованием самых современных экспериментальных методов и подходов. Последовательно решая

поставленные задачи, автор получил ряд данных, позволяющих значительно расширить современные представления не только о молекулярных механизмах и мишениях некоферментного действия тиамина как таковых, но и о сопряжении некоферментного и коферментного типов тиаминовой регуляции.

Диссертация В.А. Алешина написана по общепринятому плану и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», а также содержит благодарности и список цитируемой литературы.

Во «Введении» автор кратко характеризует актуальность выбранной для исследования темы и степень ее разработанности, четко формулирует цель и задачи работы и ее научную новизну. Не совсем традиционным выглядит представление в данной главе – в самом начале работы – разделов, более характерных для «Автореферата» диссертационной работы («Теоретическая и практическая значимость», «Методология и методы исследования»; «Объект и предмет исследования»; «Положения, выносимые на защиту»; «Степень достоверности»; «Связь с государственными программами», «Публикации», «Структура и объем диссертации», «Апробация работы», а, в особенности, раздела «Личный вклад»).

Раздел «Обзор литературы» дает представление о современном состоянии исследований по избранной автором диссертации теме. Автор характеризует тиамин и его природные производные; метаболизм тиамина у млекопитающих и проблемы, связанные с отсутствием идентификации на молекулярном уровне всех ферментов млекопитающих, осуществляющих установленные взаимные превращения тиаминовых соединений; транспорт тиамина и его фосфорных производных через мембранные, требующий наличия белковых транспортеров, регуляция экспрессии которых позволяет тканеспецифично регулировать метаболизм; описывает синтетические производные тиамина, выделяя известные фармакологические формы тиамина с улучшенной биодоступностью, а также синтетические и природные соединения-антагонисты тиамина. Автор приводит также современные

данные о роли тиамина и его производных в центральном метаболизме и патологии нервной системы человека, в том числе, заболеваний, возникающих в результате дефицита тиамина (синдром Вернике-Корсакова, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона), а также приводят данные о его значимости для поддержания природных экосистем. Несмотря на то, что обзор написан кратко, он дает полное представление об актуальности избранной темы и важности исследования роли некоферментных мишней тиамина и его производных в нейропротекторном действии тиамина при патологиях нервной ткани.

Раздел «Материалы и методы» представленной диссертационной работы изложен наиболее подробно, в нем тщательно описаны реагенты и биоматериалы, работа с клеточными и животными моделями, молекулярно-биологические, бioхимические и иммуноцитохимические методики, которые были использованы для решения поставленных задач.

В разделе «Результаты и их обсуждение» подробно и последовательно изложены полученные экспериментальные данные. Не останавливаясь на перечислении всех результатов, которые четко и ясно изложены в работе, хочу отметить положения, имеющие, на мой взгляд, наибольшее теоретическое значение. Автором (1) получены данные, свидетельствующие о потенциальной активности фосфатаз семейства DING в качестве ТМФ-аз, (2) охарактеризованы структурные детерминанты регуляции пиридоксалькиназы тиаминовыми соединениями; (3) охарактеризована суточная регуляция активности ферментов мозга: пиридоκсалькиназы, пируватдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы – и ее изменения в ответ на введение тиамина; (4) установлено влияние тиамина на уровень (де)fosфорилирования S213 и S285 пиридоксалькиназы, S293 пируватдегидрогеназы и ацетилирование K503 глутаматдегидрогеназы; (5) выявлена зависимость регуляторных эффектов тиамина от времени суток. Автором впервые получены данные о механизмах регуляции связывания GTP, ADP и лейцина глутаматдегидрогеназой при ацетилировании ее остатков лизина K503, K84, K545, K200, а также

охарактеризованы молекулярные механизмы защитного действия тиамина через белки, участвующие в тиаминовой регуляции некоферментного типа; проанализировано критическое для жизнеспособности раковых клеток сопряжение молекулярных механизмов коферментного и некоферментного действия тиамина. Таким образом, автором охарактеризованы новые молекулярные механизмы и мишени некоферментного действия тиамина.

Наряду с теоретическим, полученные автором данные могут иметь и практическое значение – результаты данного исследования открывают новые возможности не только для синтеза лекарств, имитирующих или нарушающих охарактеризованные в работе механизмы, но также и для предотвращения негативных эффектов уже существующих и использующихся в клинической практике лекарственных препаратов на поступление тиамина в клетки.

Изложенные результаты, выводы и практические рекомендации исследования обоснованы и достоверны, медицинская значимость работы не вызывает сомнения.

Следует отметить, что для проведения исследований диссертант использовал целый ряд специальных методик, модифицируя их для целей работы, очень тщательно подходя к анализу полученных экспериментальных данных, используя при необходимости биоинформационный анализ. Все представленные эксперименты тщательно документированы, а результаты статистически достоверны. Автором проведен огромный объем экспериментальной работы, что позволило ему опубликовать 18 статей в рецензируемых международных журналах, индексируемых в WoS или Scopus.

Вместе с тем, к представленной работе имеются и некоторые замечания. Определенная неудовлетворенность возникает после прочтения главы «Результаты и их обсуждение» - при несомненном обилии полученных результатов и опубликованных работ, автор обсуждает их очень кратко (если вообще обсуждает). Некоторые разделы этой главы представляют собой исключительно изложение результатов с минимальным обобщением полученных собственных данных. Из объемного списка цитируемых авторов

(раздел «Список литературы» содержит 204 ссылки), напрямую отражающего актуальность и современность выбранной автором темы, в главе «Результаты и их обсуждение» для сравнения собственных результатов с данными других авторов, имеющимися в литературе, используется около 10 работ. Возможно, было бы целесообразно более подробно сравнить собственные данные с аналогичными результатами, полученными другими авторами на иных моделях и системах, имеющиеся в литературе.

В этой же связи следует отметить некоторый «перекос» в изложении материалов. Если лаконичность раздела «Обзор литературы» оправдана четкостью изложения (объем главы 18 страниц), а подробность описания в разделе «Материалы и методы» (объем главы 23 страницы) целесообразна с точки зрения возможности использования методик другими авторами, то телеграфная краткость обсуждения (объем главы «Результаты и их обсуждение» - 36 страниц, включая графики и иллюстрации) вызывает разочарование, особенно с учетом того, что автором опубликованы 16 экспериментальных и две обзорные статьи по теме исследования.

В диссертации имеются также некоторые неудачные выражения (например, «Для предотвращения ... взаимодействий ... препаратов с поступлением в клетки тиамина»), а также незначительные технические ошибки (использованы шрифты разных размеров, сбита нумерация в оглавлении).

Однако высказанные замечания не умаляют значимости и достоинств диссертационного исследования в целом. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. 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 В.А. Алешин заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – "Биоинженерия".

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник отдела электронной микроскопии,

Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского

Алиева Ирина Борисовна



\_\_\_\_\_

Контактные данные:

тел.: +7-495-939-55-28, e-mail: irina\_alieva@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

зашита диссертация:

03.00.11 – «Эмбриология, гистология и цитология»

Адрес места работы:

119991, Россия, Москва, Ленинские горы д. 1, строение 40,

МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, Отдел электронной микроскопии

Тел.: +7(495) 939-53-59; e-mail: nataly@belozersky.msu.ru

Подпись

д.б.н., вед.н.с. Алиевой Ирины Борисовны заверяю.

Зам. директора Научно-исследовательского института физики биологии имени А.Н.Белозерского



