

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Артюхова Артема Викторовича
на тему: «Разработка способов направленной регуляции дегидрогеназ
2-оксокислот млекопитающих и особенности такой регуляции в клетках
с разным типом метаболизма»
по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»

Дегидрогеназы 2-оксокислот – привлекательный объект фундаментальных и прикладных метаболомных исследований. Ферменты этой группы служат связующим звеном в путях распада углеводов и аминокислот, которые выполняют важнейшие функции в метаболизме различных типов клеток. При всем колоссальном разнообразии строения и регуляции активности этих ферментов за счет экспрессии, сплайсинга, пост-трансляционной модификации и формирования биологических комплексов существует потенциальная возможность оказывать влияние на действие дегидрогеназ 2-оксокислот за счет низкомолекулярных синтетических регуляторов. Кажущийся универсализм этого подхода мог бы решить многие задачи прикладной и медицинской биохимии, однако выявление закономерностей такой регуляции представляет собой сложную проблему. Специфические ингибиторы дегидрогеназ 2-оксокислот, которые можно применять в фармакологии, практически отсутствуют, а применение неспецифических регуляторов может приводить к диаметрально противоположным эффектам. Постепенное выяснение деталей процессов регуляции дегидрогеназ 2-оксокислот с учетом возможных структурных, функциональных, генетических и физиологических факторов происходит поэтапно, с привлечением результатов ранее проведенных экспериментов и комплекса различных подходов. В этом контексте рецензируемая работа безусловно, актуальна и представляет внушительный арсенал использованных методов.

Диссертационная работа А.В. Артюхова посвящена разработке способов регуляции дегидрогеназ 2-оксокислот с помощью низкомолекулярных ингибиторов и применении данных ингибиторов *in vivo*. Несмотря на то, что в работе исследуются объекты с разным уровнем сложности (различные выделенные ферменты, культуры клеток, ткани животных, удачный выбор модели позволяет достаточно репрезентативно охарактеризовать изменения на уровне как отдельных метаболических узлов, так и метаболизма различных типов клеток в целом.

Работа изложена на 170 страницах текста, содержит 7 таблиц и 33 рисунка. Диссертация написана по стандартному плану и состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов и обсуждения, заключения и выводов. Список процитированной литературы включает внушительные 438 ссылок.

Обзор литературы охватывает классические данные по общей характеристике исследуемых ферментов, современные данные о вовлеченности разных типов дегидрогеназ 2-оксокислот в различные физиологические процессы в организме, а также сведения о фосфиновых и фосфиновых аналогах 2-оксокислот в качестве ингибиторов соответствующих дегидрогеназ и информацию об их применении *in vitro* и *in vivo*. По мнению оппонента, попытка структурировать на 23 страницах содержание 275 публикаций (с которым автор, безусловно, хорошо знаком), получилась не слишком удачной. Для читателя, не являющегося специалистом в предмете исследования, текст перегружен аббревиатурами и плохо иллюстрирован. Например, о структурных особенностях разнообразнейших комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот предлагается судить по приблизительной схеме, отражающей только порядок доменов в компонентах комплексов (с.21). Обзор литературы можно было бы построить иначе, или сократить, например, часть подробной характеристики участия отдельных ферментов в разных патологических процессах, поскольку эти процессы автором работы не исследуются.

Применяемые в работе методы хорошо описаны, приведенные протоколы достаточно подробны для независимого воспроизведения. Используемые методы современному состоянию биологической науки. Обращают на себя внимание оригинальные методы измерения окисленного глутатиона и измерения NAD^+ в тканях через сопряженную реакцию формиаатдегидрогеназы. Основным успехом методического сопровождения работы можно считать измерение параметров ингибирования реакции через формальные константы ферментативной кинетики, полученные при насыщении 2-оксосубстратами. Полученные значения можно непосредственно сравнивать и делать выводы о влиянии ингибиторов на активность той или иной дегидрогеназы 2-оксокислот *in vitro* и даже *in vivo*, в случае клеточного гомогената, в котором точное содержание активного фермента определить затруднительно.

Результаты работы логично разделены на три части, в соответствии с исследуемой системой. В первой части работы описываются результаты *in vitro* исследований влияния регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот на различные препараты ферментов для определения специфичности и подбор наиболее эффективных ингибиторов для 2-оксоглутаратдегидрогеназного, 2-оксоадипатдегидрогеназного и пируватдегидрогеназного комплексов.

Во второй части работы автором исследуются изменения метаболизма клеточных линий при инкубации с используемыми регуляторами. Показано, что стабильные и воспроизводимые изменения уровня метаболитов под воздействием выбранных ингибиторов происходят индивидуально для каждой клеточной линии. Полученные результаты коррелируют с уровнями экспрессии генов компонентов комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот и дают представление о возможной роли ферментов в метаболизме разных типов клеток.

В третьей части исследуются изменения в биохимии мозга крыс под действием ранее описанных регуляторов активности дегидрогеназ 2-оксокислот. Во всех исследованных случаях были обнаружены устойчивые

паттерны изменения концентрации конкретных метаболитов, из чего делаются обоснованные выводы о влиянии комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот на те или иные физиологические функции.

Часть «Обсуждение» подробно описывает имеющиеся результаты в сравнении с уже имеющимися литературными данными о применении регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот в различных областях биологической и медицинской науки. Убедительно показано, что исследованные в диссертационной работе специфические регуляторы дегидрогеназ 2-оксокислот на примере фосфоновых и фосфиновых аналогов 2-оксокислот могут эффективно и селективно ингибировать *in vivo* различные ферменты-представители дегидрогеназ 2-оксокислот, специфических для определенных клеток и тканей. Описаны новые соединения, например адипоилфосфонат, ингибирующий 2-оксоглутаратдегидрогеназы и 2-оксоадипатдегидрогеназы. Использование таких соединений позволяет установить физиологическую значимость отдельных реакций, катализируемых дегидрогеназами 2-оксокислот, с учетом клеточных и тканевых особенностей метаболизма. Исследованные соединения можно использовать в биотехнологической и медицинской практике, в частности для диагностики и терапии злокачественных трансформаций с известным типом метаболизма. Проведенное исследование показало новые возможности для специфического влияния на дегидрогеназы 2-оксокислот *in vivo*, что открывает перспективы использования фосфиновых и фосфоновых аналогов 2-оксокислот, а также тиамин для решения задач инженерии метаболизма, в медицине, биотехнологии и системной биологии.

К недостаткам работы можно отнести избыточность и многословность описанных результатов, в частности разделов, касающихся отложенных последствий действия регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот и тиамин.

По теме работы опубликованы 15 статей в рецензируемых научных изданиях, включая высокорейтинговые журналы. Достоверность полученных

результатов, на основании которых выдвинуты положения, не вызывает сомнений.

«Результаты и выводы» диссертации полностью вытекают из представленных итогов исследований, хотя достаточно сложно понять, какие из девяти тезисов являются обобщением результатов, а какие, собственно, выводами. Возможно, количество выводов можно было бы уменьшить.

В целом, работа А. В. Артюхова вносит существенный вклад в современные знания о биохимической и физиологической роли регуляции активности деоксигеназ 2-оксокислот, и связанные медицинские и биотехнологические аспекты. Актуальность избранной темы, обоснованность научных положений, сформулированных в диссертации выводов, их достоверность и новизна не вызывает сомнений.

Высказанные в рецензии замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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 Артюхов Артем Викторович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия».

Официальный оппонент:

доктор химических наук,
главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной
биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения

науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»

Мирошников Константин Анатольевич

Контактные данные:

тел.: +7(495) 335-55-88, +7(903) 569-85-74

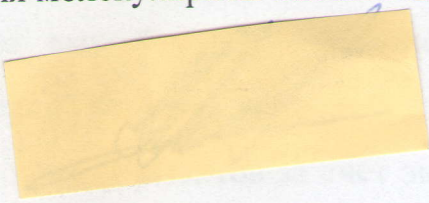
e-mail: kmi@ibch.ru kmi@bk.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.04 – «Биохимия», 03.01.06 – «Биоинженерия»

Адрес места работы:

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
ИБХ РАН, лаборатория молекулярной биоинженерии



13 мая 2022 г

Подпись сотрудника ИБХ РАН
К.А. Мирошникова удостоверяю:
Ученый секретарь ИБХ РАН



д.ф.-м.н. В.А. Олейников



13 мая 2022 г.