



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук профессора ШАБАНОВА Петра Дмитриевича
на диссертацию СЛЕПНЕВА Александра Александровича на тему
«Роль усыновленных рецепторов в регуляции клинически значимых белков-
транспортеров половыми гормонами»,
представленную к публичной защите
на соискание ученой степени доктора медицинских наук
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность проблемы

Интерес к функционированию белков-транспортеров, обеспечивающих инфлюксную и эффлюксную функцию переноса гормонов и лекарственных веществ в клетку и из нее, в последние годы существенно возрос. Это связано с выделением и изучением главным образом эффлюксных белков гликопротеина Р (Pgp) и белка резистентности рака молочной железы (BCRP) и доказательством их участия в АТФ-зависимом транспорте многих лекарственных веществ из клетки в окружающее пространство. Инфлюксные белки-транспортеры OATP1B1/OATPВ3, обеспечивающие транспорт растворимых анионов внутрь клетки без затраты энергии, менее изучены, но доказана их роль в транспорте ряда лекарственных веществ, таких как статины и сартаны. Особое место занимают ядерные белки-транспортеры, среди которых выделяют наиболее изученную часть эндокринных рецепторов, осуществляющих рецепцию и транспорт гормонов и витаминов стероидной структуры, орфанные и усыновленные рецепторы, значение которых до сих пор точно не установлено. Именно изучению роли усыновленных рецепторов в транспорте биотических и ксенобиотических веществ через ядерную мембрану клеток и посвящена работа А.А. Слепнева, которая фундаментальна по сути и направлена на практическое внедрение

полученных результатов. Выбор темы следует признать похвальным, таких исследований чрезвычайно мало и за рубежом, и в России, тема актуальна и широко востребована научной общественностью, в ней больше белых пятен, чем ясностей, и можно найти не только свой оригинальный и нужный путь, но и привнести значительную новизну в решение глобальной научной проблемы. Автор во многом опирается на работы предшественников, в частности, исходящих из лаборатории профессора Е.Н. Якушевой (Рязань), длительное время и последовательно занимающихся проблемой внутриклеточного транспорта лекарственных веществ. Рецензируемая работа вносит новое начало в их идейное содержание, уточняет методы их реализации, проводит анализ фармакологических возможностей, наконец, формулирует оригинальный подход к изучению внутриклеточного и внутриядерного транспорта лекарственных и нелекарственных веществ.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских программ, разрабатываемых в ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, где традиционно уделяют много внимания изучению фундаментальных и прикладных аспектов биомедицинской науки, что лишний раз подтверждает научную востребованность данной проблемы.

Оценка наиболее значимых результатов, полученных автором

Целью исследования диссертанта было изучение влияния половых гормонов на функционирование клинически значимых белков-транспортёров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1В1 и 1В3) и оценка роли усыновленных рецепторов (прегнан Х рецептора, конститутивного андростанового рецептора, печеночного Х рецептора альфа, фарнезоидного Х рецептора) в данном процессе. На основании цели сформулированы конкретные задачи исследования (их 6), касающиеся главным образом оценки прямого влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на активность и экспрессию генов клинически значимых белков-транспортёров (Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1В1 и 1В3) при

кратковременном и долговременном воздействии гормонов, а также изучению роли усыновленных рецепторов (прегнан X рецептора, конститутивного андростанового рецептора, фарнезоидного X рецептора, печеночного X рецептора альфа) в регуляции Р-гликопротеина, полипептидов, транспортирующих органические анионы 1В1 и 1В3, под действием половых гормонов. Для решения этих вопросов автор использовал большой набор современных молекулярно-биологических, биохимических и фармакологических методов исследования. Постановка цели и задач работы понятны, конкретны и логичны. Примененные методы исследования, а также характер и количество полученного материала адекватны цели и задачам диссертации. Значительный объем данных, их статистическая обработка, компоновка и дизайн работы, представление и высокий уровень анализа позволяют считать результаты диссертационной работы достоверными, а положения и выводы вполне обоснованными. Заключение и выводы показывают, что основные цель и задачи исследования, поставленные в работе, достигнуты.

Методология исследований была традиционной для биохимии и представляла собой исследование *in vitro* на клетках линий Caco-2 и HepG2 (анализ функционирования Pgp, BCRP и OATP1B1/OATP1B3 соответственно). Уровень изучаемых белков-транспортеров, а также усыновленных рецепторов оценивали методом вестерн-блот, экспрессию генов определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-RT). Активность транспортеров анализировали по проникновению внутрь клеток их субстратов: Pgp – фексофенадина, BCRP – сульфасалазина, OATP1B1/OATP1B3 – аторвастатина, концентрацию веществ контролировали методом ВЭЖХ-МС/МС с помощью разработанных и валидированных методик. Роль усыновленных рецепторов в регуляции транспортеров оценивали с помощью применения их специфических ингибиторов: прегнан X рецептора (PXR) – кетоконазола, конститутивного андростанового рецептора (CAR) – CINPA1, фарнезоид X рецептора (FXR) – тауро-β-холевой кислоты, печеночного X рецептора альфа (LXRα) – TFCA. Все исследования проведены на сертифицированном оборудовании.

В процессе исследований диссертантом был выявлен ряд важных закономерностей и находок. Так, в работе убедительно доказано, что эстрадиол, стимулируя конститутивный андростановый рецептор (CAR), повышает количество и активность гликопротеина Р (Pgp). Прегнан Х рецептор (PXR) повышает количество белка-транспортера, однако повышения активности гликопротеина Р при этом не происходит, так как гестаген обладает негеномной (прямой) ингибирующей активностью по отношению к молекуле транспортера. Тестостерон снижает количество гликопротеина Р, ингибируя конститутивный андростановый рецептор (CAR). Важно отметить, что изученные половые гормоны во всех концентрациях, превышающих физиологические, увеличивают количество BCRP. В реализации действия эстрадиола принимают участие конститутивный андростановый рецептор (CAR) и прегнан Х рецептор (PXR), тестостерона и прогестерона – фарнезоид Х рецептор (FXR) и прегнан Х рецептор (PXR). При этом эстрадиол повышает количество OATP1B1, действуя через конститутивный андростановый рецептор (CAR) и прегнан Х рецептор (PXR), а тестостерон увеличивает уровень данного белка-транспортера, действуя через фарнезоид Х рецептор (FXR), прегнан Х рецептор (PXR) и печеночный Х рецептор альфа (LXR α). Прогестерон также вызывает снижение количества OATP1B1. Кроме того, эстрадиол повышает уровень OATP1B3, действуя через фарнезоид Х рецептор (FXR), тестостерон увеличивает количество данного белка-транспортера за счет влияния на печеночный Х рецептор альфа (LXR α), а прогестерон не оказывает воздействия на уровень OATP1B3.

Результаты исследований репрезентативны, объемны, корректно обработаны и представлены и, безусловно, не вызывают сомнений.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Представленный большой объем экспериментальных данных кишки человека Caco-2 и гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, полученных из коллекции клеточных линий ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-

Петербург; линию Сасо-2 использовали для изучения транспортеров Pgr и BCRP, HepG2 – для исследования транспортеров OATP1B1 и OATP1B3; для анализа применяли половые гормоны эстрадиол, прогестерон и тестостерон с кратковременным и длительным воздействием, оценивая их влияние на экспрессию генов, кодирующих Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, CAR, PXR, FXR, LXR α) с использованием современных экспериментальных молекулярно-биологических, биохимических и фармакологических методов, включая корректную статистическую обработку полученных данных, четкое представление материалов диссертации в виде рисунков, таблиц и обстоятельного описания, а также достаточный анализ позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации как вполне обоснованные.

Научная новизна

Диссертант описывает в работе оригинальные данные по изучению действия половых гормонов эстрадиола, прогестерона и тестостерона на количество и активность белков-транспортеров Pgr и BCRP на клетках линии Сасо-2, при этом установлена роль усыновленных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α в данном процессе. На клетках линии HepG2 изучено влияние эстрадиола, прогестерона и тестостерона на количество и активность белков-транспортеров OATP1B1 и OATP1B3, также показана роль усыновленных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α в данном процессе. В частности, доказано, что в большинстве случаев изменение количества транспортеров (Pgr, BCRP, OATP1B1, OATP1B3) под действием половых гормонов связано с однонаправленным изменением экспрессии их генов и сопровождается соответствующей модуляцией их активности. Кроме того, выявлено, что действие половых гормонов на изучаемые белки-транспортеры через усыновленные рецепторы в клетках, которые не являются их мишенями, наблюдается при использовании гормонов в высоких концентрациях, превышающих физиологические (1, 10, 100 мкМ),

поэтому данный механизм регуляции реализуется только при терапевтическом применении гормональных лекарственных препаратов.

Рецензируемая работа может быть квалифицирована как доказательное обстоятельное исследование в области биохимии, экспериментальной фармакологии, неврологии и медицинской науки в целом.

Теоретическая и научно-практическая значимость

Теоретическое значение рецензируемой работы состоит в обосновании положения, что половые гормоны эстрадиол, прогестерон и тестостерон регулируют количество и активность клинически значимых белков-транспортеров и усыновленных рецепторов – CAR, PXR, FXR, LXR α . Так, при кратковременном воздействии на клетки Caco-2 и HepG2 установлено прямое дозозависимое тканеспецифическое ингибирующее действие половых гормонов на активность белков-транспортеров. Показано, что эстрадиол, стимулируя CAR, повышает количество и активность Pgp; прогестерон, стимулируя PXR, повышает количество данного белка-транспортера, а тестостерон снижает количество Pgp, ингибируя конститутивный андростановый рецептор.

Важно отметить, что изученные половые гормоны во всех концентрациях, превышающих физиологические, повышают количество BCRP (клинически значимого эффлюксного транспортера), причем в реализации действия эстрадиола принимают участие CAR и PXR, а тестостерона и прогестерона – FXR и PXR. Эстрадиол повышает количество другого белка-транспортера OATP1B1 (инфлюксный), действуя через CAR и PXR, а тестостерон повышает количество инфлюксного белка-транспортера OATP1B1 посредством FXR, PXR и LXR α . Прогестерон вызывает снижение количества инфлюксного OATP1B1 без участия изученных усыновленных рецепторов. Интересно подчеркнуть, что эстрадиол повышает уровень OATP1B3, действуя через FXR, тестостерон увеличивает количество данного белка-транспортера за счет влияния на LXR α , а прогестерон не оказывает воздействия на содержание OATP1B3.

При этом особенностью регуляции экспрессии белков-транспортёров половыми гормонами является то, что изменение экспрессии их генов под действием половых гормонов сопровождается однонаправленной динамикой количества транспортёров, но не всегда совпадает с изменением их активности, а длительность воздействия гормонов влияет на направленность эффекта на транспортёры. Действие половых гормонов на изучаемые белки-транспортёры через усыновленные рецепторы реализуется при применении гормонов в высоких концентрациях, превышающих физиологические, что свидетельствует о том, что данные эффекты реализуется только при терапевтическом применении лекарственных препаратов на основе половых гормонов. Следовательно, полученные результаты раскрывают механизмы влияния половых гормонов на клинически значимые белки-транспортёры в клетках, не являющихся мишенями половых гормонов (энтероциты, гепатоциты). Усыновленные рецепторы, принимающие участие в регуляции белков-транспортёров, могут рассматриваться как мишени для модуляции их активности с целью эффективной и безопасной фармакотерапии их субстратами. Основные положения исследования могут быть рекомендованы к внедрению в образовательный процесс обучающихся вузов медико-биологического профиля по дисциплинам «Биохимия», «Фармакология» и «Патологическая физиология».

Полученные данные получили всестороннюю апробацию, опубликованы в центральной печати.

Представленные в диссертации данные следует рассматривать как новые, имеющие важное теоретическое и практическое значение для биохимии, базисной и клинической фармакологии, эндокринологии и общемедицинской практики.

Результаты исследований А.А. Слепнева могут быть полезны для научно-исследовательских работ, проводимых в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербургской государственном медицинском педиатрическом университете МЗ РФ, ФМИЦ «Перспективные оригинальные биомедицинские

и фармацевтические технологии», куда структурно вошел НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (Москва), Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ (Санкт-Петербург), учреждениях Российской академии наук, Министерства здравоохранения и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и оформление работы

Работа изложена на 187 страницах машинописи, иллюстрирована 53 рисунками и 14 таблицами. Построение диссертации традиционное и соответствует ГОСТу РФ и требованиям ВАК. Диссертация включает введение (С.5-15), обзор литературы (С.16-52), главу материалов и методов исследования (С.53-69), главу результатов исследований, включающую 11 подглав (С.70-125), обсуждение полученных результатов (С.126-138), выводы (С.143-144), практические рекомендации (С.145), перспективы дальнейшей разработки темы (С.146), перечень сокращений (С.147-149), список использованной литературы (С.150-187). Литературный указатель содержит 338 ссылок (50 отечественных и 288 иностранных) на работы, опубликованные в основном за последние 10 лет. Диссертация написана хорошим литературным языком и легко читается.

Статистика

Полученные данные корректно обработаны с применением современных методов статистики. Используемые статистические методы позволяют адекватно оценивать полученные результаты.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 23 научные работы, из них 12 статей в журналах, рекомендованных ВАК (из них 10 включены в международные реферативные базы), 2 патента РФ на изобретения и 9 работ в других изданиях и сборниках научно-практических конференций. Публикации в целом отражают основные результаты, полученные в диссертационной работе.

Автореферат

Основные положения автореферата диссертации полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы.

Выводы и практические рекомендации

Диссертация содержит 10 выводов и 3 пункта практических рекомендаций. Все выводы и рекомендации обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертации. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений соискателя следует признать высокой, что обеспечивается как количественной стороной изученного материала, так и качеством его обработки.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. Вместе с тем, в ходе рецензирования диссертационной работы возникли некоторые замечания и следующие вопросы, требующие дополнительного пояснения и уточнения:

1. В работе показано, что точками приложения половых гормонов являются разные усыновленные рецепторы, например, эстрадиол повышает уровень OATP1B3, действуя через FXR, тестостерон увеличивает количество данного белка-транспортера за счет влияния на LXR α , а прогестерон не оказывает воздействия на содержание OATP1B3. Вопрос: какие общие механизмы вовлечения усыновленных рецепторов в реализацию действия гормонов автор может выделить как основные, точнее основополагающие?

2. Автор ограничился изучением действия половых гормонов на систему усыновленных рецепторов ядра. Вопрос: Если брать, к примеру другие гормоны, например, глюкокортикоидные или витамины А и Д, действие которых реализуется через ядерные структуры, по мнению автора, в какой степени и с какой спецификой участвуют усыновленные рецепторы в действии этих агентов?

3. Основные эффекты половых гормонов на систему усыновленных рецепторов автором показаны при использовании концентраций гормонов,

значительно превышающих физиологические. Вопрос: насколько эффекты повышенных концентраций гормонов совпадают с их действием в физиологических концентрациях?

4. В разделе «перспективы дальнейшей разработки темы» автор предполагает дальнейшее изучение эффектов гормонов на выделенные системы в организме (*in vivo*). Вопрос: как автор видит моделирование подобных состояний в эксперименте: введением повышенных концентраций гормонов, удалением половых желез, созданием дисфункционального состояния? Просьба поделиться соображениями на эту тему, поскольку она транслирует исследования *in vitro* в исследования *in vivo*.

5. Имеются небольшие замечания по оформлению диссертации, некоторые неточности, опечатки, неправильно расставленные знаки препинания. Однако это встречается у большинства диссертантов и не влияет на восприятие работы как научного квалификационного труда.

Говоря в целом, работа производит весьма благоприятное впечатление, как по сути, так и по оформлению.

Все приведенные вопросы и замечания не затрагивают существа работы и сформулированы в плане дискуссии.

Заключение

Диссертация Слепнева Александра Александровича на тему: «Роль усыновленных рецепторов в регуляции клинически значимых белков-транспортеров половыми гормонами», выполненная при научном консультировании доктора медицинских наук профессора Е.Н. Якушевой и представленная к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является завершенной, самостоятельно выполненной научной квалификационной работой, в которой содержится решение крупной и актуальной научной проблемы в области биохимии, вскрывающей биохимические механизмы регуляции белков-транспортеров половыми гормонами посредством усыновленных рецепторов, что имеет большое значение для биохимии, фармакологии, клинической фармакологии, неврологии и медицинской науки в целом.

Работа полностью соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (пп. 2. Биохимия белков. Протеомика. Белковая инженерия. Структурная биология; 8. Структура и метаболические функции биомембран; 11. Биохимические/метаболические/энергетические процессы в тканях и органах организма в норме и при патологии. Функциональная и клиническая метаболомика в норме и при патологии). Научная новизна и практическая значимость результатов исследования позволяют утверждать, что данное исследование соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении учёных степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Слепнев Александр Александрович, по своей эрудиции, компетенциям, авторитету, научному и практическому опыту достоин присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией биохимической фармакологии
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
доктор медицинских наук, профессор

Петр Дмитриевич ШАБАНОВ
тел. 8-921-900-1951, e-mail: pdshabanov@mail.ru
Санкт-Петербург, 197022, ул. Акад. Павлова, 12

«20» ноября 2025 года

Подпись профессора П.Д. Шабанова удостоверяю
Начальник УРП ФГБНУ «ИЭМ»



А.А. Новиков