

ОТЗЫВ

**официального оппонента, доктора медицинских наук
Федотчевой Татьяны Александровны на диссертационную работу
Слепнева Александра Александровича на тему «Роль усыновленных
рецепторов в регуляции клинически значимых белков-транспортёров
половыми гормонами», представленную на соискание ученой степени
доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия**

Актуальность темы диссертационного исследования

Актуальность диссертационного исследования Слепнева А.А. обусловлена важной ролью мембранных транспортных белков в регуляции транспорта лекарственных веществ и необходимостью углубленного изучения механизмов их регуляции. До настоящего времени роль стероидных гормонов, в частности, половых гормонов эстрадиола, прогестерона и тестостерона на функционирование ключевых представителей этих белков была малоизучена, хотя отдельные исследования выявили их уникальное действие на эти системы транспорта. В работе комплексно исследовано влияние половых гормонов на белки семейства АТФ-зависимых АВС-транспортёров (Р-гликопротеина - Pgp и белка резистентности рака молочной железы - BCRP) и транспортёров растворенных веществ - SLC-транспортёров (полипептидов, транспортирующих органические анионы OATP1B1 и OATP1B3). Так как эти белки определяют всасывание, распределение и выведение широкого спектра эндогенных соединений и лекарственных веществ, и уровень половых гормонов сильно колеблется у человека на протяжении жизни, работа охватывает очень важную область биохимии, связанную со старением организма и гендерными различиями в регуляции белков-транспортёров и адаптивных рецепторов. Особенно сложной и важной задачей является выявление роли адаптивных рецепторов половых гормонов в регуляции мембранного транспорта.

Таким образом, представленная работа вносит существенный вклад в развитие фундаментальных представлений о механизмах регуляции мембранного транспорта, которые помогут решить проблемы современной клинической практики, связанные с необходимостью повышения эффективности и безопасности фармакотерапии. Полученные результаты открывают новые перспективы для дальнейших исследований в области биохимии мембранного транспорта и разработки инновационных терапевтических стратегий.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы и практические рекомендации, представленные в диссертационной работе, отличаются высокой степенью

обоснованности и подтверждаются результатами комплексного, многоэтапного биохимического исследования.

Достоверность полученных данных обеспечена достаточным объемом исследования и использованием современных высокотехнологичных исследовательских методов, таких как ВЭЖХ-МС/МС, реал-ТАЙМ ПЦР, вестерн-блот. Для подтверждения адекватности транспортной модели использованы классические ингибиторы для Pgr – кетоконазол, для BCRP – кверцетин, для OATP1B1/B3 – рифампицин.

Обработка полученных результатов выполнена с применением адекватных методов статистического анализа, используемых в медико-биологических исследованиях.

Поставленные в работе цели и задачи последовательно решены на каждом этапе исследования, а сформулированные выводы логично вытекают из результатов и полностью соответствуют поставленным задачам. Интерпретация полученных сведений свидетельствует о глубоком понимании научной проблемы и владении информацией в полном объеме.

Таким образом, научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертации, обладают полнотой научного обоснования и практической значимостью. Они соответствуют поставленной цели и задачам исследования и подтверждаются полученными в эксперименте данными.

Достоверность и научная новизна исследования, полученных результатов

Диссертационная работа основана на комплексном, методологически корректном подходе к изучению роли адаптивных рецепторов в регуляции клинически значимых белков-транспортёров половыми гормонами. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом и корректным дизайном исследования, использованием валидированных биохимических методов, применением современных статистических методов анализа.

Диссертационная работа направлена на решение принципиально важной проблемы современной биохимии, связанной с наличием существенных противоречий в имеющихся фрагментарных литературных данных о влиянии половых гормонов на функционирование белков-транспортёров Pgr и BCRP. Особую актуальность и новизну работе придает изучение ранее не исследованных аспектов гормональной регуляции OATP1B1/OATP1B3, а также раскрытие молекулярных механизмов этого влияния через систему ядерных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α .

Выяснилось, что в разных типах клетках задействованы не одни и те же адаптивные рецепторы. На клетках линии Caco-2 эстрадиол индуцирует Pgr, действуя через CAR, прогестерон повышает количество транспортёра посредством CAR и PXR. Тестостерон, напротив, снижает уровень Pgr, подавляя активацию CAR. Эстрадиол индуцирует BCRP, действуя через CAR и PXR, прогестерон и тестостерон - через PXR и FXR.

На клетках линии HepG2 изучено влияние половых стероидов на количество, активность и экспрессию генов белков-транспортёров OATP1B1 и OATP1B3. Также исследована роль адаптивных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α в механизме их стимулирующего действия. Установлено, что действие эстрадиола на OATP1B1 опосредовано активацией CAR, а тестостерона - активацией FXR, PXR и LXR α . В отношении OATP1B3 также установлено стимулирующее действие эстрадиола и тестостерона: эстрадиола через FXR, а тестостерона через LXR α .

Результаты работы показывают, что ядерные рецепторы, являясь ключевыми регуляторами метаболизма ксенобиотиков и эндогенных соединений, являются одним из звеньев в передаче гормонального сигнала на экспрессию транспортных белков. Автором установлено, что данный механизм регуляции характерен для высоких доз гормонов в клетках кишечника и печени, которые не являются для них мишенями, однако активно участвуют в процессах всасывания и метаболизма ксенобиотиков.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Проведённое исследование обладает высокой значимостью для науки в аспекте выявления молекулярных механизмов влияния половых гормонов через систему ядерных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α на функционирование клинически значимых белков-транспортёров – Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3. Ценность представляют установленные автором закономерности концентрационно-зависимого действия гормонов на белки-транспортёры и адаптивные рецепторы.

Практическая значимость исследования определяется тем, что уровень половых гормонов значительно меняется в течение жизни и их физиологические колебания у пациентов разного пола, возраста и гормонального статуса могут существенно влиять на эффективность разных видов фармакотерапии. Кроме того, выявленные закономерности должны учитываться в клинической практике при терапии.

Так как исследование проводилось с использованием концентраций гормонов, соответствующих не только физиологическим, но и терапевтическим уровням, можно экстраполировать полученные данные на реальные клинические ситуации. Результаты исследования создают научную основу для разработки новых подходов к преодолению лекарственной резистентности и оптимизации комбинированной терапии.

Полнота освещения результатов диссертации в печати.

Результаты диссертационной работы достаточно полно освещены в печати. Автором опубликовано 23 работы, включая 12 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, в том числе 10 статей в изданиях, входящих в цитатно-аналитические базы Web of Science и Scopus. Получено 2 патента Российской Федерации. 9 статей

и тезисов докладов в материалах российских и международных конференций опубликовано в других изданиях.

Оценка структуры и содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения и нескольких глав: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы.

Диссертация изложена на 187 страницах, проиллюстрирована 53 рисунками и 14 таблицами. Список литературы включает 50 источников отечественной и 288 иностранной научной литературы.

Диссертация имеет чёткую, логически выстроенную структуру. Введение включает все ключевые элементы, необходимые для понимания исследовательской логики: обоснование актуальности темы, анализ степени её разработанности, формулировку цели и задач, определение научной новизны, теоретической и практической значимости, описание методологического подхода и используемых методов, положения, выносимые на защиту, сведения об апробации, внедрение результатов исследования в практику, личный вклад автора, сведения о публикациях, а также структуру и объём работы.

Цель исследования, сформулированная как изучение влияния половых гормонов на функционирование клинически значимых белков-транспортёров и оценка роли усыновленных рецепторов в данном процессе, полностью соответствует актуальным направлениям современной биохимии и молекулярной фармакологии. Поставленная цель носит комплексный характер и охватывает как фундаментальные аспекты регуляции мембранного транспорта, так и прикладные вопросы фармакокинетики лекарственных средств. Особенно важно, что автор не ограничился простой констатацией фактов влияния гормонов, а поставил задачу раскрыть молекулярные механизмы этого влияния через систему ядерных рецепторов.

Сформулированные задачи исследования логически вытекают из поставленной цели и образуют последовательную программу научного поиска. Первые две задачи, посвященные изучению прямого и длительного воздействия гормонов на транспортные белки, закладывают фундамент для последующего анализа роли конкретных рецепторов. Такой поэтапный подход - от феноменологического описания эффектов к раскрытию их механизмов - соответствует лучшим традициям биохимических исследований.

Особого внимания заслуживает глубокая проработка задач, связанных с изучением роли отдельных усыновленных рецепторов (PXR, CAR, FXR, LXR α) в регуляции каждого из исследуемых транспортёров. Выделение отдельных задач для каждого взаимодействия рецептор-транспортёр позволило автору получить наиболее полную и детализированную картину

изучаемых процессов. Такой подход демонстрирует системность мышления исследователя и его способность к комплексному анализу сложных биологических систем.

Важно отметить, что поставленные задачи полностью охватывают все аспекты заявленной проблемы - от изучения функциональной активности транспортеров до анализа экспрессии их генов и белков. При этом каждая задача имеет четкие критерии выполнения и верифицирована с помощью современных биохимических методов, что свидетельствует о хорошей методологической проработке исследования.

Глава «Обзор литературы» представляет собой качественную аналитическую работу, полностью соответствующую целям диссертационного исследования. Она не только отражает современное состояние проблемы, но и служит фундаментом для дальнейших экспериментальных изысканий.

Глава «Материалы и методы» отражает дизайн эксперимента, описание биохимических, биоаналитических и статистических методов исследования. Методологическая часть работы заслуживает высокой оценки. Использование современных биохимических и молекулярно-биологических подходов, включая высокочувствительные методы ВЭЖХ-МС, вестерн-блоттинг и количественную ПЦР в реальном времени, обеспечило высокую достоверность полученных результатов.

Представленная глава «Результаты исследования» является ключевой частью диссертационной работы, демонстрирующей высокий уровень научного исследования. Глава отличается четкой структурой, логической последовательностью изложения. В разделе результатов Слепневым А.А. представлен обширный экспериментальный материал, полученный с использованием современных биохимических и молекулярно-биологических методов.

Автор оценил влияние половых гормонов на активность Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 при кратковременном воздействии и установил их прямое дозозависимое тканеспецифическое ингибирующее действие на белки-транспортеры.

Внимания заслуживает проработка данных о влиянии различных концентраций половых гормонов (эстрадиола, прогестерона и тестостерона) на функциональную активность, экспрессию генов и относительное количество транспортных белков Pgp, BCRP, OATP1B1 и OATP1B3 при длительном воздействии (24 ч).

Особую ценность представляет выявленная автором концентрационная зависимость эффектов половых гормонов, где показано, что значимые изменения активности транспортеров наблюдаются только при высоких концентрациях (1-100 мкМ), что имеет важное значение для клинической практики в ходе гормональной терапии.

Автор установил, что в большинстве экспериментов наблюдаются однонаправленные изменения относительного количества транспортеров,

экспрессии, кодирующих их генов и функциональной активности транспортных белков.

При изучении роли адаптивных рецепторов в регуляции белков-транспортёров половыми гормонами убедительно продемонстрированы различия в механизмах действия различных гормонов на исследуемые транспортные системы. Методологически эти эксперименты выполнены на высоком уровне, использованы специфические ингибиторы адаптивных рецепторов PXR, CAR, FXR, LXR α .

Автор установил специфичность регуляции белков-транспортёров половыми гормонами через ядерные рецепторы в клетках кишечника и печени, которые не являются для них мишенями. Индукцию функционирования транспортёров высокими дозами половых гормонов следует рассматривать как защитный механизм клеток, который направлен на удаление избытка гормонов из энтероцитов (активация эффлюкса с помощью Pgp и BCRP) и усиление захвата гормонов гепатоцитами (активация инфлюксного транспорта с помощью OATP1B1 и OATP1B3), где стероидные гормоны подвергаются биотрансформации и элиминации.

Глава «Результаты исследования» иллюстрирована наглядными графиками и таблицами, что значительно облегчает восприятие сложного экспериментального материала. Статистическая обработка данных соответствует современным требованиям, а интерпретация результатов носит взвешенный и объективный характер.

В главе «Обсуждение» автор проводит глубокий анализ полученных данных, умело интегрируя их с существующими литературными сведениями. Особенно ценно, что автор не просто констатирует факты, а предлагает обоснованные объяснения выявленных закономерностей, рассматривая их через призму взаимодействия с ядерными рецепторами (PXR, CAR, FXR, LXR α). Такой подход позволил раскрыть молекулярные механизмы наблюдаемых эффектов и устранить существующие в литературе противоречия.

Заключение кратко и ёмко резюмирует основные итоги исследования. Выводы, научные положения и практические рекомендации обоснованно вытекают из проведённой работы и соответствуют заявленным целям и задачам. Содержание каждой главы логично соотносится с общей концепцией диссертации, что обеспечивает целостность и завершённость научного труда.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат соответствует требованиям ВАК РФ и отражает основные полученные результаты, материалы, положения и выводы диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Принципиальных замечаний по диссертационному исследованию нет.

Небольшое замечание по терминологии: термин «усыновленные» рецепторы не является широко распространенным термином в научной литературе. Может быть более корректно называть их адаптивными. Но так как данные рецепторы практически не исследуются в отечественной науке, сложно подобрать точное название на русском языке.

Также встречаются другие терминологически не совсем общепринятые обороты, такие как «субмикромольные концентрации», тамоксифен, антиэстрогенное соединение (стр.45), получение тотальных клеточных лизатов (стр.59).

В литературном обзоре есть тезис, который не заканчивается выводом. Например: “Анализ сдвига электрофоретической подвижности, проведенные с ядерными экстрактами клеток MCF-7, которые содержат эстрогеновый рецептор (англ.: estrogen receptor, ER) (ER α -положительные), параллельно с ядерными экстрактами MDA-MB-231 ER α -отрицательных клеток, выявили сдвиг полосы, возникающий в результате связывания ER α с зондом, содержащим промотор гена, не наблюдаемый в клетках MDA-MB-231”. Следовало пояснить, что означает сдвиг полосы (что рецептор ER α связывается с ДНК-промотором только в клетках MCF-7, где он присутствует, и не связывается в клетках MDA-MB-231, где его нет).

В дизайне исследования (Рисунок 5) желательно было переименовать экспериментальные “группы” в экспериментальные “блоки”.

При анализе результатов исследования в порядке дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. Почему для анализа транспортной функции Pgr была выбрана клеточная линия Сасо-2, а для OATP1B1 и OATP1B3 клеточная линия НерG2?
2. Какие гипотезы можно выдвинуть, объясняя разницу в действии женских половых гормонов прогестерона и эстрадиола и мужского полового гормона тестостерона на активность транспортных белков?
3. С точки зрения практического значения работы активность и экспрессию какого адаптивного рецептора следует прежде всего оценивать в клинической практике перед назначением гормональной терапии?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Слепнева Александра Александровича «Роль усыновленных рецепторов в регуляции клинически значимых белков-транспортёров половыми гормонами», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение крупной научной проблемы – выявление роли ядерных рецепторов в механизмах регуляции

белков-транспортёров Pgp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3 половыми гормонами, имеющей важное научно-практическое значение для биохимии.

Диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Слепнев Александр Александрович, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

профессор кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии им. П.В. Сергеева Института биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет), доктор медицинских наук

Федотчева Татьяна Александровна

« 20 » 11 2025 г.

Подпись д.м.н. Т.А. Федотчевой удостоверяю:

Ученый секретарь Ученого совета
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
(Пироговский Университет), к.м.н., доцент



О.М. Демина

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

E-mail: rsmu@rsmu.ru

Телефон: 8(495)434-05-43