

ОТЗЫВ

официального оппонента, старшего научного сотрудника лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха, доктора биологических наук, **Шумаева Константина Борисовича** на диссертационную работу Сучковой Ольги Николаевны «Механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 под действием S-нитрозоглутатиона в эксперименте *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Сучковой Ольги Николаевны посвящена изучению механизмов регуляции белка-транспортера OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона, являющегося физиологическим донором оксида азота (II). OATP1B1 – инфлюксный транспортер, относящийся к суперсемейству SLC-транспортеров. Данный белок был открыт только в 1999 г поэтому его функции и механизмы регуляции активно изучаются в настоящее время. В частности, установлено, что данный белок экспрессируется преимущественно в гепатоцитах, а одними из основных факторов, регулирующих его экспрессию, являются печеночный X рецептор (LXR α) и фарнезоидный X рецептор (FXR).

NO – сигнальная молекула, которая регулирует многочисленные физиологические и патофизиологические процессы – сосудистый тонус, нейротрансмиссию, воспаление, апоптоз и т.д. На данный момент влияние NO на активность и экспрессию OATP1B1 не изучалось.

Особенностью NO является то, что эта молекула является реакционноспособной и короткоживущей, поэтому в экспериментах и клинической практике используют не сам NO, а его доноры. Одним из основных доноров NO является S-нитрозоглутатион. Поскольку S-нитрозоглутатион самостоятельно не проникает внутрь клеток на данный момент активно ведется поиск транспортных систем, которые могут принимать участие в данном процессе. Вместе с тем, возможная роль OATP1B1 в трансмембранном транспорте S-нитрозоглутатиона в настоящее время не исследована.

Все это и обусловило актуальность и новизну диссертационного исследования.

Научная новизна исследования и полученных результатов

В ходе выполнения диссертационного исследования была поставлена и успешно реализована задача по оценке роли полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в переносе S-нитрозоглутатиона через клеточную мембрану. Установлено, что донор NO не переносится изучаемым белком-транспортером.

Впервые было установлено, что S-нитрозоглутатион в концентрациях 10-50 мкМ увеличивает относительное количество и активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 и способствует повышению экспрессии гена *SLCO1B1*. Также показано, что NO-pГЦ-цГМФ сигнальный путь, ядерный фактор эритроидного происхождения Nrf2, печеночный X рецептор (LXR α) вносят существенный вклад в регуляцию полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности

Указанная область научных исследований соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки), а именно пунктам: 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.

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

В рамках выполнения диссертационного исследования автором была сформулирована цель исследования, которая заключается в оценке участия полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона, проведении анализа влияния донора NO на функционирование транспортера и изучении биохимических механизмов его регуляции *in vitro*.

Цель исследования отражает и раскрывает тему диссертационной работы, а положения, выносимые на защиту, соответствуют поставленным в ней задачам. Использованные автором биохимические, аналитические, математические и статистические методы являются современными и адекватными. Выводы и практические рекомендации полностью соответствуют цели и задачам диссертационного исследования, подтверждаются достаточным количеством экспериментов и основаны на имеющих высокую достоверность результатах.

Научная и практическая значимость полученных результатов

Теоретическая значимость полученных результатов заключается в том, что впервые установлено, что S-нитрозоглутатион не является субстратом OATP1B1, однако данный транспортер может участвовать в трансмембранном переносе глутатиона.

Впервые показано индуцирующее действие S-нитрозоглутатиона на экспрессию гена SLCO1B1, белка OATP1B1 и на его активность. Установлено, что ап-регуляция OATP1P1 осуществляется через NO-цГМФ сигналинг и транскрипционные факторы Nrf2 и LXR α .

Полученные результаты имеют важное практическое значение и позволяют прогнозировать развитие межлекарственных взаимодействий, опосредованных OATP1B1, доноров NO и субстратов транспортеров.

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов на кафедрах биологической химии, фармакологии, а разработанные методические подходы были внедрены в работу центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Содержание работы, ее оформление и завершенность

Диссертационная работа представляет полностью завершенный труд, написанный по традиционному плану, содержит 56 рисунков и 9 таблиц, состоит из введения, 3 глав, обсуждения. Работа завершается заключением, выводами, практическими рекомендациями, перспективами. В списке литературы приведено 212 источников отечественной и зарубежной литературы.

Во введении автором последовательно и подробно раскрыты актуальность темы исследования и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология, представлены основные, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов.

Обзор литературы в полном объеме освещает данные современных исследований по теме диссертации. Подробно описана структура, локализация, функции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 особенности его работы и механизмы регуляции. Представлены современные данные о биохимии и сигнальной функции NO, дается подробная характеристика S-нитрозоглутатиона, как эндогенного донора оксида азота (II). Особо стоит отметить, что автор уделил внимание и подробно описал тест-систему – клетки линии HepG2, использованные в исследовании. Таким образом в литобзоре раскрыты не только современные исследования в данной области, но и описаны применяемые методические подходы.

Глава «Материалы и методы» исследования посвящена более конкретному описанию объектов и методов исследования. Диссертационная работа выполнена *in vitro* на высоком методическом уровне с применением современных и разнообразных биохимических методов, позволяющих полностью решить поставленные в диссертации задачи. Методические подходы изложены очень подробно, что позволяет воспроизвести все выполненные эксперименты.

Отличительной особенностью работы является использование большого числа передовых методов исследования, в частности: цитохимии, вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени, высокоэффективная жидкостная хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектирование.

Также особо стоит отметить, что для исследования S-нитрозоглутатиона как возможного субстрата OATP1B1 использовались трансфицированные клетки HEK293-SLCO1B1.

Результаты исследования, приведенные в главе 3, соответствуют цели исследования и сгруппированы в соответствии с задачами. Полученные автором

экспериментальные данные в достаточной мере проиллюстрированы графиками, что позволяет получить целостное представление о выполненной работе.

В ходе исследования было установлено, что в клетках HepG2 S-нитрозоглутатион повышает содержание оксида азота (II), который в свою очередь в физиологических концентрациях оказывает цитопротекторное действие, активирует транскрипционные факторы и OATP1B1, а в высоких – оказывает токсический эффект, проявляющийся в активации апоптоза, ухудшении функционирования митохондрий и ингибировании активности OATP1B1 при сохраненной экспрессии *SLCO1B1*.

На основании полученных результатов автором было показано, что полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 не участвует в переносе S-нитрозоглутатиона через мембраны клеток HepG2, тогда как глутатион может являться субстратом OATP1B1.

Эксперименты с использованием ингибиторов транскрипционных факторов позволили установить, что индуцирующее действие S-нитрозоглутатиона реализуется через растворимую гуанилатциклазу, Nfr2 и печеночный X рецептор подтипа α .

В обсуждении автор приводит тщательный анализ собственных экспериментальных данных и сопоставляет их с зарубежными и отечественными литературными источниками, связанными с областью диссертационного исследования, что позволяет качественно интерпретировать и объяснить полученные результаты.

Выводы диссертационного исследования Сучковой Ольги Николаевны обоснованы и сформулированы четко, полностью соответствуют задачам и логически вытекают из результатов исследования.

Подтверждение полученных результатов диссертации в научных изданиях

По результатам диссертационной работы опубликовано 17 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, 3 публикации в журналах, входящих в цитатно-аналитическую базу данных Scopus, 1 патент РФ на изобретение, 1 рационализаторское предложение. Стоит

подчеркнуть и значительный уровень апробации (полученные результаты были представлены в докладах на 6 конференциях).

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание и основные положения диссертационной работы. Оформление автореферата соответствует современным требованиям.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний к содержанию диссертации нет. В тексте работы встречаются отдельные орфографические и стилистические ошибки. В процессе ознакомления с работой возникли некоторые вопросы:

1. Как вы можете объяснить, что при добавлении S-нитрозоглутатиона к клеткам происходило увеличение уровня NO, а уровень глутатиона повышался кратковременно. Так как вами показано, что S-нитрозоглутатион распадается на NO и глутатион, можно было бы ожидать, что их внутриклеточное содержание будет увеличиваться пропорционально.

2. В исследовании вами показано, что NO-цГМФ сигнальный путь принимает участие в регуляции Nrf2. Выясняли ли вы участие NO-цГМФ сигнального пути в регуляции LXR α ?

3. Учитывая, что вы выполнили работу на опухолевых клетках, могут ли полученные вами результаты быть полезны при терапии онкологических заболеваний, в частности гепатоцеллюлярной карциномы?

Заключение

Диссертация Сучковой Ольги Николаевны «Механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 под действием S-нитрозоглутатиона в эксперименте *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, содержит решение научной задачи установление

механизмов регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 под действием донора NO S-нитрозоглутатиона. Диссертационная работа соответствует всем 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 кандидата наук, а ее автор, Сучкова Ольга Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,
доктор биологических наук
(03.01.04 - Биохимия)

«19» мая 2025  Шумаев Константин Борисович

Подпись д.б.н. Шумаева К.Б. заверяю
Ученый секретарь Федерального государственного
учреждения «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
кандидат биологических наук



Орловский А.Ф.

119071, г.Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
Тел.:+7(916)642-14-19
E-mail: tomorov@mail.ru