

УТВЕРЖДАЮ
Ректор федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования
«Рязанский государственный
медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор
Р.Е. Калинин
«16» апреля 2025 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 под действием S-нитрозоглутатиона в эксперименте *in vitro*» выполнена на кафедре биологической химии.

В период подготовки диссертации соискатель Сучкова Ольга Николаевна работала ассистентом кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В 2007 году окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по специальности «Фармация».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 1816 выдана в 2024 году федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет

имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: Абаленихина Юлия Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, профессор кафедры.

По итогам обсуждения диссертации принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1) является инфлюксным белком-транспортером суперсемейства переносчиков растворенных веществ SLC.

Среди печеночных транспортеров OATP1B1 (SLCO1B1) имеет высокую клиническую значимость, так как участвует в транспорте эндогенных соединений (желчные кислоты, тиреоидные гормоны, стероидные сульфаты, конъюгаты глюкуронида, пептиды) и лекарственных препаратов (статины, бромсульфоталеин, босентан, валсартан и олмесартан). Установлено, что дисфункция OATP1B1 связана с различными клиническими нарушениями, включая генетические мутации и ингибирование активности этого транспортного белка, что следует учитывать при назначении и корректировке доз лекарственных препаратов. Данный факт подчеркивает важность проведения исследований, посвященных оценке активности и механизмов регуляции OATP1B1 в различных условиях, а также поиск ингибиторов/активаторов OATP1B1.

Механизмы регуляции OATP1B1 активно изучаются. В настоящее время описана регуляция белка-транспортера за счет прямого взаимодействия с молекулой-ингибитором, а также транскрипционная, посттранскрипционная и посттрансляционная регуляции OATP1B1.

Оксид азота II (NO) – это биологически активная молекула, которая регулирует многочисленные физиологические процессы, например, сосудистый

тонус, нейротрансмиссию, функционирование иммунной системы, а также проявляет антиоксидантную и противовоспалительную активность. В высоких концентрациях оксид азота способен образовывать активные формы азота, вследствие чего изменяется редокс-статус клетки. Одним из защитных механизмов в условиях изменения уровня активных форм кислорода/азота является ядерный фактор эритроидного происхождения (Nrf2) за счет активации антиоксидантных систем. NO обладает высокой реакционной способностью, поэтому быстро окисляется во внутриклеточной среде, что ограничивает его действие как модулятора сигнальных путей. По этой причине оксид азота депонируется в клетке в виде нитрозотиолов, основным из которых является S-нитрозоглутатион (SNOG). По сравнению с другими донорами NO (органическими нитратами и нитритами, металлическими нитрозильными комплексами и т.д.) SNOG является эндогенной молекулой, не вызывает развитие феномена толерантности и обладает низкой токсичностью.

S-нитрозоглутатион инициирует основные сигнальные каскады NO, в частности NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный путь. Роль NO-pГЦ-цГМФ-сигнального пути в регуляции OATP1B1 на данный момент еще не исследована. С другой стороны, S-нитрозоглутатион не обладает способностью свободно проникать через клеточную мембрану. Установлено, что во внеклеточной среде S-нитрозоглутатион метаболизируется с образованием глутатиона и оксида азота, который, в свою очередь, способен диффундировать внутрь клетки. Кроме этого, доказано, что ключевой механизм проникновения S-нитрозоглутатиона в клетку связан с переносом нитрозогруппы от S-нитрозоглутатиона к другим аминокислотам, содержащим тиольные группы. После этого глутатион и образовавшиеся S-нитрозотиолы поступают в клетку посредством специализированных транспортных систем, однако роль белков-транспортеров, в частности семейства SLC, не изучена в этом процессе. Учитывая субстратную специфичность OATP1B1, можно предположить, участие транспортера в трансмембранном переносе SNOG в гепатоцитах, что также требует экспериментального подтверждения. Оценка принадлежности SNOG к субстратам/модуляторам

ОАТР1В1, а также изучение механизмов регуляции функционирования полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 при воздействии S-нитрозоглутатиона *in vitro* позволит не только расширить имеющиеся фундаментальные знания о белке-транспортере, но и использовать новые данные в клинической практике при назначении и корректировке доз лекарственных препаратов при патологиях, сопровождающихся развитием нитрозативного стресса.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором самостоятельно выполнен обзор литературы, проведена большая часть экспериментальных работ, обработка и интерпретация результатов, подготовка публикаций по диссертационной работе. Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы составляет более 90%.

Объем и характер заимствованных фрагментов текста диссертации позволяют считать их законными цитатами.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой. Работа выполнена на клеточных культурах НерG2 и НЕК293 (иммортиализованные клеточные линии), НЕК293-SLCO1В1 (трансфицированные клеточные линии) с использованием современных высокотехнологичных биохимических методов: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, флуоресцентные зонды, вестерн-блот, высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией и фотометрические методы анализа.

Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), множественные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта, попарное сравнение всех групп осуществляли с помощью теста Тьюки, в тексте указано точное значение критерия Фишера (F), критический уровень

значимости принимали при $p < 0,05$. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные в таблицах и графиках представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$) при нормальном распределении данных.

Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований со статистической обработкой результатов с помощью программы GraphPad Prism 10.

Достоверность первичных материалов подтверждена их экспертной оценкой и не вызывает сомнений. Научные положения, полученные выводы и практические рекомендации достаточно обоснованы и логически вытекают из результатов исследования. В исследовании использован достаточный объем литературных источников как отечественных, так и иностранных авторов.

Новизна результатов проведенных исследований

В ходе выполнения диссертационной работы впервые была оценена роль OATP1B1 в переносе S-нитрозоглутатиона через клеточную мембрану. Установлено, что S-нитрозоглутатион не является субстратом полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1. Доказано участие OATP1B1 в транспорте глутатиона. Установлено, что S-нитрозоглутатион метаболизируется до глутатиона и оксида азота (II), в свою очередь, NO в физиологических концентрациях увеличивает относительное количество и активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 и способствует повышению уровня гена SLCO1B1. Выявлено, что NO-pГЦ-сигнальный путь, ядерный фактор эритроидного происхождения Nrf2, печеночный рецептор X (LXR α) вносят существенный вклад в механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2 в эксперименте *in vitro*.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Результаты работы имеют важное практическое значение.

При дальнейшем проведении дополнительных экспериментов *in vivo*, клинических исследований, полученные результаты могут использоваться при назначении и

корректировке доз лекарственных препаратов субстратов OATP1B1 совместно с донорами оксида азота, а также при патологиях, сопровождающихся развитием нитрозативного стресса. В качестве экспериментальной модели *in vitro* индукции активности и количества полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 может использоваться воздействие S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10-50 мкМ в течение 24 и 72 ч. Растворимая гуанилатциклаза, Nrf2 и LXR α могут рассматриваться как мишени для модулирования активности полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1.

Ценность научных работ соискателя

Полученные научные данные по механизмам регуляции функционирования полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, в том числе транскрипционными факторами Nrf2, LXR α и посредством сигнального пути NO-pГЦ, могут быть использованы в качестве инструмента регуляции экспрессии и активности белка-транспортера, в том числе лекарственными препаратами при патологиях, развивающихся на фоне нитрозативного стресса. Доказанное в работе участие OATP1B1 в транспорте глутатиона дополняет имеющиеся фундаментальные знания о субстратах полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1. Выявленное индуцирующее действие S-нитрозоглутатиона на экспрессию SLCO1B1, количество и активность OATP1B1 является новым методическим подходом регуляции белка-транспортера в экспериментах *in vitro*. Определение ключевой роли NO-pГЦ-сигнального пути и транскрипционного фактора Nrf2 в механизме регуляции функционирования OATP1B1 позволит рассматривать их в качестве фармакологической мишени.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационная работа посвящена оценке принадлежности S-нитрозоглутатиона и глутатиона к субстратам белка-транспортера OATP1B1 и исследованию молекулярных механизмов регуляции функционирования полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона в эксперименте *in vitro*. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

**Полнота изложения материалов диссертации в работах,
опубликованных соискателем**

По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 5 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, 3 из которых индексируются в международных цитатно-аналитических базах данных Web of Science и Scopus, получен 1 патент РФ на изобретение.

1. S-Nitrosoglutathione Is Not a Substrate of OATP1B1, but Stimulates Its Expression and Activity / Y.V. Abalenikhina [et all.] // *Biomolecules*. – 2025. – V.15, i.3. – P. 428-444. (Co-auth. Shchulkin A.V., Suchkova O.N., Ananyeva P.D., Mylnikov P.Yu., Yakusheva E.N., Suchkov I.A., Kalinin R.E.)

2. Индуцирующее влияние S-нитрозоглутатиона на экспрессию и активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1) в клетках линии HepG2 / О.Н. Сучкова [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2025. – Т.70, № 1. – С. 29-36. (Соавт. Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Мыльников П.Ю., Гаджиева Ф.Т., Кочанова П.Д., Узбеков М.Г., Якушева Е.Н.)

3. Регуляция печеночных транспортеров OATP1A2 И OATP1B1 под действием оксида азота (II) / Ю.В. Абаленихина [и др.] // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2024. – Т.7, № 227. – С. 114-121. (Соавт. Сучкова О.Н., Костюкова Е.В., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.)

4. S-нитрозоглутатион как индуктор нитрозативного стресса и апоптоза / О.Н. Сучкова [и др.] // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2024. – Т. 27, № 9. – С. 50-56. (Соавт. Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Костюкова Е.В., Кочанова П.Д., Гаджиева Ф.Т., Якушева Е.Н., Узбеков М.Г.)

5. Изменение относительного количества белка-транспортера OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона *in vitro* / О.Н. Сучкова [и др.] // *Прикладные информационные аспекты медицины*. – 2024. – Т. 27, № 3. – С. 44-50. (Соавт. Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Гаджиева Ф.Т., Узбеков М.Г., Якушева Е.Н.)

6. Патент RU 2823925 C1 РФ (51) МПК C12N 5/07 (2010.01). Способ повышения количества полипептида, транспортирующего органические анионы

1В1(ОАТР1В1) / Якушева Е.Н., Сучкова О.Н., Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Гаджиева Ф.Т.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 2024100677; зарегистр. 12.01.2024, опубл. 30.07.2024.

Диссертация «Механизмы регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1В1 под действием S-нитрозоглутатиона в эксперименте *in vitro*» Сучковой Ольга Николаевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на межкафедральном заседании кафедр: биологической химии; фармакологии; математики, физики и медицинской информатики; биологии; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики; патофизиологии; центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Присутствовало на заседании профессорско-преподавательского состава 18 человек. Результаты голосования: «за» – 18 человек; «против» – нет; «воздержалось» – нет (протокол № 1 от 7 апреля 2025 года).

Председатель межкафедрального заседания:
заведующий кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор

Якушева Елена Николаевна

Подпись д.м.н., профессора Якушевой Е.Н. заверяю:
ректор
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор



Калинин Роман Евгеньевич