



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197022

тел.: +7 (812) 234-6868; факс: +7 (812) 234-9489; e-mail: iem@iemspb.ru; https://iemspb.ru

ОКПО 01897179 ОГРН 1037828000198 ИНН/КПП 7813045787/781301001

25.01.2024 № 424-2/04-21
на № _____ от _____

«Утверждаю»

И.о. директора ФГБНУ

«Институт экспериментальной медицины»
доктор медицинских наук, профессор

Сергей Борисович Шевченко

«25» января 2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Институт экспериментальной медицины»

о научно-практической значимости диссертационной работы

Сеидкулиевой Адамианы Аманмамедовны на тему

«Влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на функционирование
прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора»,

представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность работы

Прегнан X рецептор (PXR) и конститутивный андростановый рецептор (CAR) являются факторами транскрипции, принимающими участие в регуляции экспрессии множества генов посредством взаимодействия с лигандами, коактиваторами и корепрессорами, контролируя таким образом поддержание гомеостаза, метаболические процессы организма и

дифференцировку клеток. В настоящее время известен ряд веществ, являющихся лигандами данных рецепторов, однако поиск их селективных ингибиторов и индукторов остается актуальным.

PXR и CAR имеют классическое строение ядерных рецепторов и состоят из следующих доменов: N-концевой, ДНК-связывающий, лиганд-связывающий, С-концевой. Данные рецепторы экспрессируются преимущественно в печени, кишечнике, почках.

Известно, что развитие многих патологических процессов может приводить к образованию активных форм кислорода и азота, которые могут выполнять регуляторную роль, запуская внутриклеточные сигнальные каскады, такие как Keap1-Nrf2-ARE и тирозинкиназа-зависимый сигнальный путь. Оксид азота (II) – сигнальная молекула, регулирующая многочисленные биохимические и физиологические процессы. В то же время гиперпродукция активных форм кислорода и азота и снижение емкости системы антиоксидантной защиты может привести к развитию окислительного и нитрозативного стресса и, как следствие, к нарушению работы клеток и даже к их гибели.

В единичных исследованиях оценивалось влияние окислительного стресса и доноров оксида азота (II) на данные рецепторы, однако полученные результаты носят противоречивый характер, а механизмы данного воздействия не изучались. Поэтому в рамках диссертационной работы была поставлена задача проанализировать влияние прооксиданта пероксида водорода и донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование PXR и CAR, изучить механизмы данного влияния, а также оценить роль рецепторов в защите клеток при окислительном и нитрозативном стрессе.

Работа А.А. Сеидкулиевой представляет собой фундаментальное исследование, направленное на решение практических медицинских задач. Такое сочетание – фундаментальность и практичность – делает работу востребованной не только для биохимического и фармакологического сообщества, но и для медицины в целом.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе А.А. Сеидкулиевой впервые показано разнонаправленное действие пероксида водорода и донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество PXR и CAR в зависимости от концентрации и длительности воздействия. Убедительно продемонстрировано, что

повышение относительного количества PXR под действием пероксида водорода опосредовано воздействием малонового диальдегида, а индукция CAR – транскрипционным фактором Nrf2. Выявлено, что индукция PXR и CAR при воздействии S-нитрозоглутатиона опосредуется воздействием продукта нитрозативного стресса – битирозина. Уменьшение количества PXR и повышение уровня CAR при низких концентрациях донора оксида азота II опосредуется NO-цГМФ-сигнальным путем. Доказано, что PXR и CAR не играют защитной при развитии окислительного и нитрозативного стресса, а наоборот повышают чувствительность клеток к их развитию.

Достоинством диссертационной работы является применение иммуноцитохимического метода анализа для определения внутриклеточной локализации PXR и CAR в условиях воздействия пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона. Было выявлено, что увеличение относительного количества рецепторов не сопровождается их активацией, так как они не транслоцируются в ядро, а концентрируются в цитоплазме.

Полученные автором новые данные о механизмах регуляции функционирования PXR и CAR обуславливают научную новизну полученных результатов и выводы диссертационной работы.

Степень обоснованности и достоверности результатов, научных положений, выводов и рекомендаций

Основные положения, выводы и рекомендации, изложенные в диссертации, базируются на результатах грамотно спланированного доклинического исследования. Методически правильный подход к изучению проблемы, четкое формулирование цели и задач исследования, обширный материал экспериментальной работы достаточны для решения поставленных задач и научных обобщений. Использование современных методик, сертифицированного оборудования с применением оригинальных наборов реагентов, воспроизводимость результатов, статистическая обработка данных, анализ полученных результатов и критическая оценка результатов собственной работы подтверждают достоверность исследования, обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций. Следует подчеркнуть, что при проведении исследования автором было использовано множество современных аналитических, биохимических, иммунохимических методов анализа. Соответствующая адекватная статистическая обработка данных позволяет судить о достоверности полученных результатов. Научные положения, выводы и практические

рекомендации сопоставимы с результатами исследования и соответствуют целям и задачам работы.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности

Указанная область научных исследований соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки), а именно пунктам: 1. Проблемы строения, свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов в биологических объектах, изучение молекулярной организации структурных компонентов, выяснение путей метаболизма и их взаимосвязей; 9. Выяснение физико-химических основ функционирования важнейших систем живой клетки с использованием идей, методов и приемов химии, включая структурный и стереохимический анализ, частичный и полный синтез природных соединений и их аналогов, разработку препаративных и технологических методов получения природных веществ и их химических модификаций в непосредственной связи с биологической функцией этих соединений; 10. Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты диссертационной работы А.А. Сеидкулиевой вносят существенный вклад в развитие представлений о возможных молекулярных механизмах регуляции ядерных рецепторов PXR и CAR в условиях развития окислительного и нитрозативного стресса, а также расширяют знания об их роли в защите клеток при данных процессах.

Выявленные способы регуляции PXR и CAR могут использоваться для их направленной модуляции. Так, пероксид водорода в концентрациях 10-100 мкМ при 24-часовом воздействии и в концентрациях 5-50 мкМ при 72-часовом воздействии можно использовать для индукции PXR и CAR соответственно; кратковременное воздействие S-нитрозоглутатиона в диапазоне концентраций 1-500 мкМ можно использовать с целью ингибирования PXR, а длительное воздействие этого вещества в концентрации 500 мкМ – для ингибирования

CAR. Кроме того, было выявлено, что важную роль в изменении относительного количества PXR и CAR играют накапливаемые продукты окислительного и нитрозативного стресса малоновый диальдегид и битирозин соответственно.

Полученные результаты исследования могут быть внедрены в учебный процесс кафедр биологической химии и фармакологии при проведении практических занятий, семинаров, а также при чтении лекций и составлении учебно-методических пособий.

Таким образом, представленная диссертационная работа имеет высокую научно-практическую значимость.

Содержание и характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа А.А. Сеидкулиевой построена традиционно, изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, заключение, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, выводы, список сокращений, список литературы.

Диссертация иллюстрирована рисунками, графиками и таблицами, что повышает ее наглядность. Список литературы представлен 272 источниками, из которых 30 отечественных и 242 зарубежных публикации.

Тема диссертации соответствует заявленной научной специальности.

В первой главе представлен обзор отечественной и зарубежной литературы. Изложены современные представления о структуре, внутриклеточной локализации, механизмах регуляции, функциях, известных лигандах PXR и CAR. Описаны сигнальная роль пероксида водорода и оксида азота (II). Далее в обзоре приведены имеющиеся в литературе сведения о влиянии активных форм кислорода и азота на данные транскрипционные факторы.

Во второй главе подробно описаны использованные для проведения исследования современные методы, такие как: вестерн-блот, иммуноцитохимия, спектрофотометрия. Используемые в работе материалы и методы соответствуют цели и поставленным задачам. Объектом исследования послужила клеточная линия Caco-2. Эксперимент был разделен на два этапа, каждый из которых включал пять серий. Первый этап был направлен на изучение механизмов влияния пероксида водорода, а второй этап – на изучение механизмов влияния S-нитрозоглутатиона на относительное количество и внутриклеточную локализацию PXR и CAR.

Полученные данные обрабатывались адекватными статистическими методами с применением программного обеспечения «Statsoft Statistica 13.0» и GraphPad Prism 8, что не оставляет сомнений в правильности полученных данных.

В третьей главе приведены полученные автором результаты исследований. Глава состоит из 10 разделов, в которых подробно описано влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на биохимические показатели, характеризующие выраженность окислительного и нитрозативного стрессов, жизнеспособность клеток, относительное количество изучаемых рецепторов, их внутриклеточную локализацию, а также представлены механизмы данного влияния.

Установлено, что пероксид водорода при экспозиции 3 ч не влияет на относительное количество PXR и CAR, при длительности воздействия 24 ч в концентрациях 10-100 мкМ повышает уровень PXR и не влияет на CAR, при 72-часовом эксперименте в концентрациях 5-50 мкМ увеличивает содержание CAR, а в концентрациях 50-100 мкМ и 100 мкМ уменьшает количество PXR и CAR соответственно. Повышение количества изучаемых рецепторов не сопровождается их транслокацией в ядро. Конечный продукт перекисного окисления липидов малоновый диальдегид может повышать относительное количество PXR, а транскрипционный фактор Nrf2 принимает участие в индукции CAR.

Автором показано, что донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион при длительности воздействия 3 ч в концентрациях 1-500 мкМ снижает относительное количество PXR, при 24-часовой экспозиции в концентрациях 1-50 мкМ повышает, в концентрации 500 мкМ снижает уровень PXR, а при длительности эксперимента 72 ч в концентрациях 10-500 мкМ снижает относительное количество PXR, в концентрациях 1-50 мкМ увеличивает, а в концентрациях 100 и 500 мкМ уменьшает содержание CAR. Повышение количества изучаемых рецепторов не сопровождается их транслокацией в ядро. Продукт нитрозативного стресса – битирозин вызывает индукцию PXR при длительности воздействия 24 ч и индукцию CAR при экспозиции 72 ч. Ингибирование NO-цГМФ-сигнального пути предотвращает снижение относительного количества PXR, вызванного GSNO при экспозиции 3 и 72 ч, а также препятствует повышению уровня CAR при 72-часовом воздействии донора оксида азота (II) в концентрации 1 мкМ.

В завершении, автором установлено, что PXR и CAR снижают устойчивость клеток к окислительному и нитрозативному стрессу.

Далее следует раздел «Обсуждение полученных результатов», в котором

автор объясняет результаты проведенного исследования, сопоставляет их с современными сведениями научных статей отечественных и зарубежных авторов по изучаемой проблеме.

Выводы и практические рекомендации Сеидкулиевой А.А. обоснованы и сформулированы четко, полностью соответствуют задачам и логически вытекают из результатов исследования.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью соответствует содержанию работы и оформлен согласно принятым требованиям ВАК Минобрнауки России.

Публикации результатов исследования в научных изданиях

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, 5 из которых изданы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в базы Web of Science и Scopus; получен 1 патент на изобретение; результаты исследований представлены на 10 конференциях международного и российского уровня.

Замечания и вопросы к диссертационной работе

Принципиальных замечаний к изложенным в диссертации результатам, их интерпретации и сформулированным выводам не возникло. Однако при прочтении диссертации возник ряд вопросов, сформулированных в плане дискуссии и не затрагивающих сути работы.

1. Автор рассматривает пероксид водорода только в качестве индуктора окислительного стресса, при этом время воздействия агента на биологические системы исчисляется часами (от 3 до 24 ч). Это отмечено в самой работе и вошло в выводы 1 и 2. Однако известна и в последние годы весьма активно продвигается идея перепрофилирования использования пероксида водорода (см. публикации А.Л. Уракова и др., 2020-2023), в частности, что пероксид водорода в невысоких концентрациях (3-4,5%) следует использовать как пиолитическое, оксигенирующее, реаниматологическое средство при обструкции дыхательных путей. Вопрос: Как выводы автора согласуются или не согласуются с подобными идеями?

2. Рецептор прегнана X и конститутивный андростановый рецептор (CAR) относятся к стабильным, конститутивным биомолекулам. Автор ставил

целью уточнить влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона, прежде всего, на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора. Выводы работы показывают, что это влияние минимальное и опосредовано оно не самими факторами воздействия (пероксидом водорода и S-нитрозоглутатионом), а сопутствующими продуктами окислительного и нитрозативного стресса, да и то после воздействия на культуру в течение 24 или 72 ч. Просьба пояснить, насколько корректно поставлена цель исследования и в конечном итоге, чего добивался диссертант с практической точки зрения?

3. В работе встречаются стилистические и орфографические недочеты, но это всегда встречается в любой квалификационной работе.

В целом, диссертация является законченным научным трудом, оставляет очень хорошее впечатление по форме и стилю изложения, высказанные замечания и предложения не являются принципиальными, и ни в коей мере не умаляют достоинств работы.

Заключение

Диссертация Сеидкулиевой Адамианы Аманмамедовны на тему «Влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора», выполненная под руководством доктора медицинских наук доцента А.В. Щулькина и представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является самостоятельным законченным научным квалификационным исследованием, в котором решена актуальная научная задача, заключающаяся в обосновании молекулярных механизмов действия пероксида водорода и донора оксида азота II S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора и их роли в защите клеток от воздействия окислительного и нитрозативного стресса, что имеет важное значение для биохимии и фундаментальной медико-биологической науки в целом.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Сеидкулиевой Адамианы Аманмамедовны соответствует пункту 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ в редакции № 415 от 18.03.2023), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук, а ее автор, Сеидкулиева Адамиана Аманмамедовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», протокол № 02/2024 от 23.01.2024 г.

Заведующий лабораторией биохимической фармакологии и отделом нейрофармакологии имени С. В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» доктор медицинских наук профессор

Шабанов Петр Дмитриевич

Контактная информация:

197022, г. Санкт-Петербург, улица академика Павлова, д. 12

Телефон: 8 (812) 234-68-68; e-mail: iem@iemspb.ru

Григорий Шабанов Ю
Удостоверено
Нагальский УРП и
ФГБНУ, ИЭМ



Шабанов Петр Дмитриевич