

«УТВЕРЖДАЮ»

**Проректор по научной и инновационной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ**

**им. И.М. Сеченова Минздрава России
профессор, академик РАН**



С.Н. Авдеев

2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

о научно-практической значимости диссертационной работы Абаленихиной Юлии Владимировны на тему «Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы

Окислительный стресс (ОС) представляет собой дисбаланс между уровнем прооксидантов и антиоксидантов, который способствует развитию патологического состояния клетки. Известно, что многие заболевания характеризуются накоплением продуктов перекисного окисления липидов, белков, нуклеиновых кислот. Однако, в настоящее время всё больше появляется сведений не только о повреждающей и маркерной роли продуктов пероксидации, но и активно обсуждается их сигнальная роль.

Р-гликопротеин (Pgp) – это мембранный эффлюксный белок суперсемейства ABC-транспортеров, участвующий в переносе биобiotиков и ксенобiotиков. Активность белка-транспортера Pgp может индуцироваться или ингибироваться под влиянием различных факторов и веществ эндогенной и экзогенной природы. Механизмы регуляции Pgp в условиях ОС являются вопросом неизученным, а имеющиеся данные о влиянии пероксида водорода и бутионинсульфоксими́на (БСО) на количество и активность белка-транспортера носят противоречивый характер, что и послужило обоснованием для выполнения данной диссертационной работы.

Важно отметить, что образующиеся в результате ОС продукты пероксидации также могут влиять на функционирование Pgp. Поэтому

изучение механизмов регуляции Pgp в условиях ОС позволит более полно представить патогенез заболеваний, сопровождающихся развитием ОС, и научно обосновать рациональные методы терапии.

Цель исследования - оценить функционирование мембранного белка-транспортера Pgp и роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в его регуляции в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Диссертационная работа Абаленихиной Юлии Владимировны является законченным научно-исследовательским трудом с высокой степенью новизны. Экспериментальное моделирование окислительного стресса разной этиологии – экзогенной природы под действием пероксида водорода и эндогенной – под действием ингибитора γ -глутамилцистеинсинтетазы – DL-бутионинсульфоксимины (БСО), позволило автору получить значительное количество оригинальных данных и впервые определить целый ряд новых биохимических механизмов регуляции белка-транспортера Pgp.

В диссертационной работе впервые доказано, что БСО является прямым ингибитором Pgp с IC₅₀ (концентрация, ингибирующая активность Pgp на 50%) 17,21 \pm 2,46 мкМ, что сопоставимо с IC₅₀ классического ингибитора Pgp верапамила и уступает показателю хинидина.

Отдельно стоит отметить, впервые полученные данные о механизмах регуляции Pgp в условиях окислительного стресса *in vitro*. Выявлено, что в механизмах повышения количества Pgp при развитии экзогенного ОС, вызванного H₂O₂, доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1; HIF1 α и CAR также принимают участие в данном процессе. PXR не оказывает существенного влияния на регуляцию белка-транспортера при экзогенном ОС. Установлено, что при моделировании эндогенного ОС с помощью ингибитора синтеза глутатиона - БСО, все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути (Nrf2-keap1, HIF1 α , PXR, CAR) вносят вклад в индукцию Pgp.

Важными и новыми результатами являются также полученные автором данные о транспорте малонового диальдегида Р-гликопротеином, что указывает на защитную функцию белка-транспортера. Кроме этого, впервые описана сигнальная роль малонового диальдегида в отношении регуляции количества и активности Pgp, за счет действия через транскрипционные факторы CAR и PXR.

Особенно ценным является то, что в ходе работы были разработаны и запатентованы способы повышения относительного количества

конститутивного андростанового рецептора и прегнан Х рецептора, а также способ ингибирования Р-гликопротеина в экспериментах *in vitro*.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Полученные результаты имеют теоретическое и практическое значение. Доказанные в работе пути регуляции активности Pgp могут использоваться в целях повышения или снижения функционирования белка-транспортера через транскрипционные факторы Nrf2, HIF1 α , CAR при экзогенном воздействии прооксиданта, Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR при дефиците внутриклеточных антиоксидантных ферментов. Стоит подчеркнуть практические рекомендации по использованию апробированной методики анализа содержания МДА методом ВЭЖХ МС/МС, которая может быть рекомендована в качестве способа оценки степени развития окислительного стресса и перераспределения продукта ПОЛ между внутриклеточным и внеклеточным пространством.

Также хотелось бы отметить, что полученные результаты открывают новое направление дальнейших исследований, в частности, внутриклеточный сигналинг продуктов окислительного стресса в опытах *in vitro*.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль на всех этапах исследования. Абаленихиной Ю.В. самостоятельно проведен анализ современных литературных источников по изучаемой проблеме, сформулирована тема исследования, определены ее цель и задачи. Автором разработаны дизайн исследования и методы его проведения, выполнены эксперименты и набор биологического материала, биохимические анализы, обработка и интерпретация полученных данных, подготовка публикаций по теме диссертационной работы, написание всех глав диссертации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов, проведенных в исследовании

Результаты, выводы и практические рекомендации, представленные в диссертационной работе Абаленихиной Юлии Владимировны, имеют важное научно-практическое значение.

В связи с тем, что клеточная линия Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике, полученные данные о повышении абсорбции веществ-субстратов Pgp при развитии заболеваний, сопровождающихся ОС, следует учитывать в клинической практике, т.к. это может приводить к увеличению их концентрации в плазме крови и сопровождаться развитием побочных эффектов фармакотерапии.

Ингибирующее действие БСО может использоваться для подавления активности Pgp в ткани опухоли, что целесообразно для снижения

множественной лекарственной устойчивости, опосредованной гиперфункцией белка-транспортера, и повышения эффективности химиотерапии.

Целесообразно продолжить на кафедрах биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО и фармакологии Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова изучение влияния различных патологических воздействий на функционирование Р-гликопротеина и посттрансляционные механизмы его регуляции.

Результаты исследования могут быть внедрены в учебный процесс кафедр биологической химии и фармакологии медицинских ВУЗов при чтении лекций и проведении практических занятий, а также при подготовке учебно-методической литературы по данным дисциплинам.

Печатные работы

По материалам диссертации опубликовано 48 научных трудов, из них 16 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 13 – в изданиях, входящих в международную цитатноаналитическую базу данных Scopus, внедрено 4 рационализаторских предложения, получено 3 патента на изобретение Российской Федерации.

Оценка содержания работы, ее завершенность

Работа написана по традиционному плану. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы (446 источников), иллюстрирована 30 таблицами и 75 рисунками.

Во введении дано обоснование актуальности темы, указаны степень разработанности проблемы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описана методология и методы исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор отечественной и зарубежной литературы. Изложены современные сведения о структуре и функционировании Р-гликопротеина, описаны основные механизмы его регуляции, подробно представлены причины и последствия развития окислительного стресса, а также имеющиеся данные о влиянии окислительного стресса на функционирование данного белка-транспортера.

Во второй главе описаны материалы и методы, применяемые в исследовании. Работа была выполнена на клетках линии Сасо-2. Эксперимент состоял из нескольких этапов: моделирование окислительного стресса, определение количества и активности Р-гликопротеина, выявление роли транскрипционных факторов в регуляции белка-транспортера. Для

реализации поставленных задач были использованы современные биохимические методы исследования: иммуноферментный анализ, вестерн-блот, ВЭЖХ с УФ-детектированием, ВЭЖХ МС/МС, а также детекция активных форм кислорода с использованием флуоресцентных зондов. Особенно стоит подчеркнуть, что в ходе работы были выполнены эксперименты по ингибированию окислительного стресса с антиоксидантом глутатионом, а также использовались селективные ингибиторы для каждого транскрипционного фактора, что указывает на методическую грамотность и высокую достоверность полученных результатов.

В третьей главе наглядно представлены полученные результаты, а в четвертой – их обсуждение.

В ходе исследования было показано, что тестируемые вещества - пероксид водорода и бутионинсульфоксимин вызывают развитие окислительного стресса. При этом бутионинсульфоксимин обладает бимодальным эффектом, реализуя свое действие как за счет образования активных форм кислорода, так и самостоятельно ингибирует Pgr при кратковременном воздействии.

При изучении механизмов влияния окислительного стресса на активность Р-гликопротеина было установлено, что при экзогенном окислительном стрессе существенный вклад вносят транскрипционные факторы Nrf2, NIF и CAR, а при эндогенном еще и PXR.

Все результаты, приведенные в тексте, таблицах и на рисунках статистически обработаны и указаны отличия.

Сформулированные выводы базируются на статистически выявленных закономерностях, полностью отражают результаты исследования, отличаются четкостью формулировок и обоснованностью. Выводы и практические рекомендации логично вытекают из результатов исследования, соответствуют поставленным цели и задачам, имеют научно-практическое значение.

Автореферат полностью отражает содержание работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Работа написана хорошим литературным языком, легко читается, хорошо иллюстрирована и заслуживает положительной оценки. Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений.

Принципиальных замечаний и недостатков в оформлении не возникло. Местами встречаются неудачные стилистические выражения и опечатки, которые не снижают научно-практическую ценность работы.

При чтении диссертации возникли следующие вопросы:

