

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Шумаева Константина Борисовича на диссертационную работу Судаковой Елены Александровны на тему: «Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro*», представленную в диссертационный совет 21.2.060.02 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

### Актуальность темы исследования

Одним из важнейших медиаторов внутриклеточного и межклеточного взаимодействия в организме человека является оксид азота (II). В настоящее время доказано, что оксид азота (NO) является универсальным регулятором разнообразных функций организма, включая дыхание, иммунный ответ организма, активности макрофагов, агрегации тромбоцитов, сосудистого тонуса, экспрессии генов, пластичности нервной ткани, высвобождения других нейротрансмиттеров.

Помимо вышеуказанных свойств, несомненно участие NO в реакциях окислительного и нитрозативного стресса, глутамат-кальциевого каскада и воспаления. Свойства NO как эффектора в тех или иных реакциях зависят от количества и места продукции данного соединения. Таким образом, оксиду азота, в зависимости от конкретных условий, свойственны и повреждающие, и защитные функции.

Р-гликопротеин является мембранным белком-транспортером, который экспрессируется во многих органах и тканях организма. Основная функция белка-транспортера заключается в выведении веществ из клеток во внеклеточную среду и биологические жидкости. В настоящее время доказана и общепризнана важнейшая роль данного белка в транспорте эндогенных и экзогенных веществ, а также в обеспечении устойчивости опухолевых клеток

к лекарственной терапии.

Учитывая важнейшую роль NO в регуляции физиологических функций организма логичным и оправданным, является изучение роли данной молекулы в модуляции активности Р-гликопротеина. В ряде работ, посвященных данной тематике, были получены противоречивые результаты, кроме того, не было изучено дозозависимое действие и механизмы реализации эффекта NO. На решение данных проблем и было направлено диссертационное исследование Судаковой Елены Александровны, что обуславливает его высокую научную значимость и актуальность.

### **Анализ решенных задач**

Автором в ходе выполнения диссертационного исследования была сформулирована цель изучить влияние донора NO S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина и оценить роль цГМФ-сигнального пути, ядерного фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в данном процессе.

Для реализации поставленной цели автор ставит перед собой следующие задачи: изучить влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество белка-транспортера Р-гликопротеина в клетках линии Caco-2 *in vitro*; изучить влияние S-нитрозоглутатиона на активность Р-гликопротеина в клетках линии Caco-2 *in vitro*; исследовать механизмы влияния S-нитрозоглутатиона на количество и активность Р-гликопротеина, в том числе выяснить участие в этих механизмах нитрозативного стресса, цГМФ-сигнального пути и ряда транскрипционных факторов (ядерного фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора, конститутивного андростанового рецептора).

Успешное решение в ходе выполнения диссертационной работы всех поставленных соискателем задач позволили реализовать цель исследования и сформулировать обоснованные выводы.

## **Анализ научной новизны и достоверности результатов исследования**

Научная новизна диссертационной работы подтверждается тем, что впервые показано разнонаправленное действие S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина в зависимости от концентрации и длительности воздействия. Установлено, что вызванное S-нитрозоглутатионом снижение количества и активности Р-гликопротеина связано с повреждением его молекулы вследствие развития нитрозативного стресса. В диссертационной работе Судаковой Е.А. выявлено, что повышение относительного количества Р-гликопротеина при воздействии низких концентраций S-нитрозоглутатиона реализуется через NO зависимый цГМФ-сигнальный путь, а при увеличении концентрации S-нитрозотиола через фактор эритроидного происхождения 2 и конститутивный андростановый рецептор. Вместе с тем доказано, что прегнан X рецептор не участвует в регуляции Р-гликопротеина под действием S-нитрозоглутатиона.

Достоверность и надежность результатов диссертационной работы Судаковой Е.А. обеспечена выполнением достаточного объема исследований и применением адекватных методов статистической обработки данных, что позволяет корректно интерпретировать полученные экспериментальные факты.

Научные положения и выводы диссертационной работы хорошо аргументированы и существенно дополняют современные представления о функционировании Р-гликопротеина в условиях повышения уровня NO.

## **Анализ теоретической и практической значимости**

В ходе диссертационного исследования автором выяснены механизмы разнонаправленного влияния S-нитрозоглутатиона на количество и активность Р-гликопротеина, что может послужить предпосылкой к разработке новых способов направленной регуляции этого белка.

Полученные в диссертационном исследовании данные о изменении активности Р-гликопротеина под действием S-нитрозоглутатиона расширяют

представление об абсорбции веществ-субстратов белка-транспортера в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся нитрозативным стрессом, а также при назначении лекарственных препаратов – доноров NO, например, пролонгированных нитратов, что, в свою очередь, может повысить эффективность и безопасность проводимой фармакотерапии.

### **Объем и структура работы**

Диссертационная работа включает в себя все регламентированные ГОСТ 7.0.11-2011 основные структурные элементы и состоит из введения, 3 глав, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейших исследований, списка сокращений, списка литературы, она иллюстрирована 25 рисунками и 8 таблицами.

Анализ введения. В данном разделе 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. Дополнительно, раздел содержит сведения о личном вкладе автора, а также о публикациях по теме исследования, об объеме и структуре диссертации.

Анализ глав диссертации. В обзоре литературы автор грамотно и квалифицированно представляет известные на данный момент сведения о механизмах синтеза оксида азота и его донорах, функциях NO в норме и при развитии патологий, а также обосновывает выбор S-нитрозоглутатиона в качестве донора NO в проведенном исследовании. Далее следуют теоретические разделы, включающие данные о структуре, локализации, основных функциях, субстратной специфичности и модуляторах функционирования Р-гликопротеина, о регуляторных механизмах функциональной активности Р-гликопротеина под действием оксида азота и транскрипционных факторов. Количество и набор проанализированных

источников свидетельствуют о достаточно глубоком знании автором современного состояния проблемы. Необходимо отметить, что в числе литературных источников, соискатель использует и анализирует работы сотрудников РязГМУ Минздрава России.

Глава материалы и методы исследования содержит подробное описание примененных в диссертационной работе современных биохимические методов, в частности иммуноблоттинга и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В целом объект исследования (эксперименты выполнялись на культуре клеток аденокарциномы ободочной кишки человека – линия Сасо-2) и используемые методики вполне адекватны поставленным целям и задачам.

Особенно стоит подчеркнуть, что для выявления механизмов влияния оксида азота на Р-гликопротеин автором были применены селективные ингибиторы растворимой гуанилатциклазы, конститутивного андростанового рецептора, прегнан Х рецептора и фактора эритроидного происхождения 2.

Результаты экспериментов, приведенные в главе 3, вполне соответствуют цели исследования и сгруппированы в соответствии с задачами. Эти результаты в достаточной мере проиллюстрированы таблицами и графиками, что позволяет получить целостное представление о выполненной работе.

В ходе проведенных Судаковой Е.А. исследований было установлено, что добавление S-нитрозоглутатиона к клеткам линии Сасо-2 приводит к повышению содержания метаболитов NO в лизате клеток, что свидетельствует о проникновении S-нитрозотиола через клеточную мембрану. Концентрации S-нитрозоглутатиона 1-10 мкМ оказались безопасными для клеток, в то время как 100 и 500 мкМ при длительности экспозиции 24 ч и 50, 100, 500 мкМ при экспозиции 72 ч снижали выживаемость клеток по результатам цитотоксического теста. После воздействия S-нитрозоглутатиона на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч количество Р-гликопротеина достоверно не изменялось, однако в то же время отмечалось снижение его активности. Если длительность эксперимента увеличивалась до 24 ч количество и активность Р-гликопротеина возрастала при концентрациях S-нитрозоглутатиона 10 и 50

мкМ, при концентрации 100 мкМ повышался уровень белка-транспортера, тогда как активность не изменялась, а при повышении концентрации донора NO до 500 мкМ отмечалось снижение уровня Р-гликопротеина. При длительности воздействия 72 ч S-нитрозоглутатион в концентрации 10 мкМ повышал количество и активность Р-гликопротеина, а в концентрации 100 и 500 мкМ вызывал снижение уровня белка-транспортера. На заключительном этапе исследования были изучены механизмы повышения количества и активности Р-гликопротеина под действием NO. Выявлено, что повышение относительного количества Р-гликопротеина при воздействии низких концентраций S-нитрозоглутатиона реализуется через зависимый от оксида азота цГМФ-сигнальный путь. В случае возникновения нитрозативного стресса при увеличении концентрации донора NO этот эффект реализуется через фактор эритроидного происхождения 2 (Nrf2). Вместе с тем, более интенсивный нитрозативный стресс приводит к снижению жизнеспособности клеток линии Сасо-2.

К достоинствам диссертационной работы можно отнести обсуждение автором собственных результатов, в том числе их сопоставление с данными зарубежных и отечественных исследований, что позволяет корректно и логично объяснить, и интерпретировать обнаруженные эффекты.

Анализ выводов. Выводы диссертационного исследования Судаковой Е.А. обоснованы и сформулированы четко, полностью соответствуют задачам и логически вытекают из результатов исследования.

Нужно также отметить, несомненную научно-практическую значимость диссертационной работы, в частности для разработки новых подходов в терапии онкологических заболеваний.

По результатам диссертационной работы опубликовано 13 работ: 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в базы Web of Science и Scopus; результаты исследований представлены на 10 конференциях международного и российского уровня.

## Замечания по диссертации

Принципиальных замечаний к диссертационной работе Судаковой Е.А. нет. Тем не менее при прочтении возникли некоторые замечания и пожелания, не влияющие на положительную оценку диссертации.

В целом изложение материала диссертационного исследования является хорошим, но в работе имеются орфографические и стилистические недочеты.

В порядке дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. Чем обусловлен выбор S-нитрозоглутатиона в качестве донора NO?
2. Чем обусловлен выбор изучаемых транскрипционных факторов и могут ли другие, неисследованные факторы принимать участие в данном процессе?
3. Поскольку S-нитрозотиолы в живых системах могут превращаться в динитрозильные комплексы железа, не опосредованы ли некоторые эффекты S-нитрозоглутатиона этими комплексами?

## Заключение

Диссертация «Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro*» Судаковой Елены Александровны, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, содержит решение научной задачи исследование влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина и оценки роли цГМФ-сигнального пути, фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в данном процессе, имеющей большое значение для развития современной биохимии.

Диссертация соответствует всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на

соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Судакова Елена Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

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)

«4» мая 2023 г.  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: tomorrow@mail.ru