

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, заведующего лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России Штиля Александра Альбертовича на диссертационную работу Абаленихиной Юлии Владимировны «Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы

Диссертация исследует актуальную проблему на стыке фундаментальной биохимии и клеточной биологии. Трансмембранный транспорт низкомолекулярных соединений – важнейший механизм регуляции гомеостаза клеток, от бактерий до высших эукариот. Этот механизм поддерживает оптимальное равновесие по обе стороны плазматической мембраны, обеспечивая активный обмен внутриклеточной среды с окружением. С практических позиций трансмембранный транспорт важен для фармакодинамических эффектов лекарств: именно достижение критической концентрации препарата определяет результат воздействия. Следовательно, транспорт зависит от внутриклеточных процессов. Какие процессы могут быть регуляторами трансмембранного транспорта?

Исторически первым механизмом, выводящим из клетки ксенобиотики, стал Р-гликопротеин (ABCB1, Pgp) – белок с молекулярной массой 140-170 кДа, выводящий ксенобиотики благодаря конформационным изменениям, приобретаемым в результате гидролиза АТФ. Ген *MDR1*, кодирующий Р-гликопротеин, активируется в ответ на многочисленные воздействия, в т.ч. лекарственные. Эта особенность обуславливает интерпретацию Р-гликопротеина как стресс-реагирующего белка. При этом недостаточно исследованы механизмы посттрансляционной регуляции Р-гликопротеина и, следовательно, трансмембранного транспорта в целом.

Ю.В. Абаленихина поставила фундаментальную проблему: установить механизм регуляции функции Р-гликопротеина посредством изменений редокс-баланса клетки.

Таким образом, тема диссертационного исследования Абаленихиной Ю.В. является актуальной.

Основное содержание работы – исследование механизмов регуляции Р-гликопротеина в культивируемых клетках человека Сасо-2 при воздействии веществ, изменяющих окислительно-восстановительный баланс клеток.

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*.

Задачи исследования

1. Воспроизвести модель экзогенного окислительного эустресса и дистресса *in vitro* с помощью пероксида водорода на клетках линии Сасо-2.
2. Воспроизвести модель эндогенного окислительного эустресса и дистресса *in vitro* с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимины на клетках линии Сасо-2.
3. Оценить количество и активность Pgp в условиях экзогенного окислительного стресса *in vitro*.
4. Исследовать принадлежность DL-бутионинсульфоксимины к модуляторам активности Pgp.
5. Оценить количество и активность Pgp в условиях эндогенного окислительного стресса *in vitro*.
6. Изучить роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при экзогенном окислительном стрессе.
7. Изучить роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при эндогенном окислительном стрессе.
8. Исследовать принадлежность малонового диальдегида к субстратам и

модуляторам активности Pgp.

9. Оценить роль Pgp в выживаемости клеток при развитии окислительного стресса.

Научная новизна

Впервые установлено разнонаправленное действие окислителей на количество и активность Р-гликопротеина: разные агенты в разных концентрациях регулируют транспортер неодинаково, а характер регуляции зависит от повреждающего или адаптивного действия окислителей.

Впервые выявлены окислители, ингибирующие Р-гликопротеин-зависимый транспорт в микромолярных концентрациях.

Установлена роль транскрипционного механизма Nrf2-keap1 в регуляции Р-гликопротеин-зависимого транспорта.

Особенно важно, что индукция Р-гликопротеина при развитии окислительного стресса выполняет защитную функцию и способствует выживаемости клеток.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 249 страницах машинописи (формат А4) и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследований», «Обсуждение полученных результатов», выводов, практических рекомендаций и анализа перспектив исследования, списка сокращений, списка литературы. Работа содержит 75 рисунков и 30 таблиц. Библиографический материал включает ссылки на 446 источников литературы.

Во Введении определены научная новизна и практическая значимость исследования. Представлены основные положения, выносимые на защиту. Раздел написан убедительно, представлена актуальность проблемы для фундаментальной биологии и практической медицины.

Глава I. Обзор литературы отлично структурирован, содержит большой (но не излишний) объем современной информации о молекулярных механизмах транспорта ксенобиотиков посредством Р-гликопротеина. Автор исследует регуляцию экспрессии гена *MDR1*, кодирующего Р-гликопротеин в

клетках человека, а также посттранскрипционные механизмы регуляции указанного транспортера. Затем анализируется литература о редокс-балансе клетки и отдельных факторах (главным образом, окислителях), обуславливающих этот баланс.

Раздел написан высокопрофессиональным языком, важные вопросы освещены с разных сторон и должны быть понятны широкому читателю. На основании анализа массива источников автор ставит проблематику собственной работы: каковы механизмы регуляции Р-гликопротеин-опосредованного транспорта окислителями и каково биологическое значение этого регуляторного механизма? Считаю, что обзор литературы может быть опубликован как самостоятельная работа. Отдельные спорные формулировки подлежат редактированию.

Глава II. «Материалы и методы исследования»

Исследование выполнено на высоком методическом уровне. Автор показывает уверенное, профессиональное владение методами к анализу транспорта ксенобиотиков, биохимическими подходами к регуляции внутриклеточного редокс-баланса разнообразными фармакологическими инструментами, а также молекулярным анализом белков. Широкий методический репертуар позволяет выполнить именно междисциплинарное исследование и удачно сочетать различные подходы для построения целостной регуляторной схемы. Методы описаны детально, отдельные процедуры можно воспроизвести по протоколам. Методы статистической обработки результатов адекватны. В этом разделе диссертации автор также демонстрирует высокий профессионализм и хорошую научную школу.

В последующих разделах представлены результаты собственных исследований и их анализ.

Собственные результаты автора убедительно показывают возможность регулировать активность Р-гликопротеина через изменение окисления-восстановления экзогенными агентами.

Автор выполнил широкомасштабное исследование на различных по тканевому происхождению линиях клеток человека и панели фармакологических модуляторов. Такая широта важна для суждения об общебиологическом значении регуляторных механизмов. Отдельные агенты действуют по-разному, и сужение объема экспериментальной материалы было бы неправомерным. Эксперименты представлены как детальные зависимости эффекта от времени воздействия и концентрации агента, что необходимо для вывода о динамике функции Р-гликопротеина. Экспериментальный раздел хорошо продуман, правильно использованы контроли – автор вновь и вновь демонстрирует профессионализм.

К незначительным недостаткам следует отнести пропуски отдельных результатов в рисунках: напрашивается более полное представление данных. Это усилило бы убедительность интерпретации.

Разделы «Обсуждение результатов» раскрывает умение диссертанта детально и критически анализировать собственные данные. Как и предыдущие разделы, написано ясным языком, подписи под рисунками лаконичны. Автор представил интересное толкование собственных научных результатов с привлечением данных мировой литературы. Такой анализ помогает развивать дальнейшие исследования молекулярных механизмов регуляции транспорта ксенобиотиков.

Выводы сформулированы четко, достоверны, логично и обоснованно вытекают из результатов исследования, соответствуют поставленным задачам.

Список литературы отражает разносторонность подхода автора, весьма полон и содержит источники последних лет.

Публикации. 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 базу данных Scopus, получено 3 патента на изобретение, внедрено 4 рационализаторских предложения. Публикации отражают основные положения диссертационной работы.

Таким образом, Ю.В. Абаленихина выполнила современное исследование в области биологической химии. Ценность и новизна полученных диссертантом результатов состоит в установлении механизмов (в перспективе – и возможности терапевтического воздействия) регуляции трансмембранного транспорта клеток эукариот посредством изменений окислительно-восстановительного баланса.

В диссертации установлены важные и оригинальные научные закономерности. Уровень диссертационной работы высокий; не вызывает сомнений значимость диссертации как современного высококвалифицированного исследования актуальной научной проблемы с практическими перспективами.

Замечания по диссертационной работе

Принципиальных замечаний по выполненной диссертационной работе нет. Работа включает уникальные результаты комплексного экспериментального исследования, тщательно продумана, выстроена логично.

При чтении диссертации возникли вопросы:

1. Чем обусловлен выбор ингибиторов транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR, какие преимущества они имеют и какова их селективность?
2. Как осуществлялся подбор концентраций малонового диальдегида для экспериментов, соотносились ли эти концентрации с теми, которые получены в ходе моделирования экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*?

Вопросы не снижают научной и практической значимости работы и могут быть разобраны во время защиты диссертации.

Заключение

Диссертация Абаленихиной Юлии Владимировны «Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*», представленная к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является

законченной научно-квалификационной работой, открывающей новое направление в биологической химии, а именно, возможность регулировать трансмембранный транспорт ксенобиотиков посредством изменений редокс-баланса, и имеющей значение для развития фундаментальных представлений о функциях клеток эукариот, а также создания механизм-направленных лекарств, что отвечает потребностям развития Российской Федерации.

Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в последующих редакциях), а ее автор, Абаленихина Юлия Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,
заведующий лабораторией
механизмов гибели опухолевых клеток
НИИ канцерогенеза
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Штиль Александр Альбертович

Подпись д.м.н. А.А. Штиля заверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, кандидат медицинских наук



Кубасова Ирина Юрьевна

«21» апреля 2023 г.

Контактные данные:
тел.: 7(499)612-7834, e-mail: shtilaa@yahoo.com

Адрес места работы:
федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза. 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24,
Тел.: 7(499)612-7834; e-mail: info@ronc.ru