

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

Калинин Р. Е.

«10» января 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования

«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro*» выполнена на кафедрах биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО и фармакологии.

В период подготовки диссертации соискатель Судакова Елена Александровна работала на кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в должности ассистента.

В 2012 году окончила Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации по специальности «Медико-профилактическое дело».

Справка об обучении № 1767 выдана в 2023 году федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени

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

Научный руководитель: Щулькин Алексей Владимирович, 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 фармакологии, профессор кафедры.

По итогам обсуждения диссертации принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

P-гликопротеин (P-gp, ABCB1) – АТФ-зависимый белок-транспортер, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров и обеспечивающий выведение субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. P-gp экспрессируется в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителии почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров, а также в опухолевых клетках. Благодаря данной локализации основными функциями данного белка-транспортера являются участие в фармакокинетике лекарственных веществ и резистентности опухолей к химиотерапии.

Активность P-gp может изменяться под воздействием различных факторов и веществ. При этом индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белка-транспортера, а ингибиторы (кетоназол, верапамил) ее снижают.

P-gp обладает низкой субстратной специфичностью, то есть его субстратами является широкий спектр лекарственных веществ: противоопухолевые препараты, новые пероральные антикоагулянты, сердечные гликозиды, блокаторы кальциевых каналов и т.д. Изменение активности P-gp может повлиять на эффективность и безопасность терапии данными веществами.

Механизмы регуляции P-gp продолжают активно изучаться, в частности, постоянно ведется поиск эндогенных и экзогенных веществ, модулирующих активность белка-транспортера.

Согласно современным представлениям ключевую роль в регуляции активности P-gp играет уровень экспрессии гена *MDR1* (multidrug resistance gene), кодирующего данный белок-транспортер, и изменение активности уже синтезированного белка. Экспрессия гена *MDR1* инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора, называемого «*MDR1* enhanceosome». Транскрипционные факторы, такие как, прегнан X рецептор (PXR), конститутивный андростановый рецептор (CAR), транскрипционный фактор эритроидного происхождения 2 (Nrf2), могут активировать синтез P-gp.

Оксид азота II (NO) – сигнальная молекула, обладающая широким спектром физиологических эффектов. Показано, что NO участвует в синаптической передаче сигнала, нейрогенезе, вазодилатации, развитии воспаления, повреждении клеток и т.д.

Основные физиологические функции NO реализуются через NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный каскад.

В то же время, гиперпродукция данной молекулы может привести к развитию нитрозативного стресса. Нитрозативный стресс (НС) представляет собой совокупность биохимических реакций, в ходе которых NO и активные формы азота вызывают повреждение биомакромолекул белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот и, как следствие, формирование патологии.

В ряде исследований оценивалось влияние доноров NO на количество и активность P-gp. Однако, в данных работах получены противоречивые результаты. Кроме того, не было изучено дозозависимое действие NO и, что самое главное, механизмы его реализации.

На ликвидацию данных пробелов и было направлено настоящее исследование.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором было исследовано влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на клеточную линию Caco-2, в зависимости от концентрации (1, 10, 50, 100, 500 мкМ) и времени воздействия (3, 24, 72 часов). Был установлен

диапазон токсических концентраций S-нитрозоглутатиона. Подтверждено развитие нитрозативного стресса в клетках Caco-2, и его выраженность. Оценено трансэпителиальное сопротивление монослоя клеток Caco-2 при действии S-нитрозоглутатиона. Определено относительное количество и активность Р-гликопротеина во всех сериях эксперимента. Оценено влияние ингибиторов транскрипционных факторов на уровень Р-гликопротеина.

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

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне с использованием статистических методов: Для оценки статистической значимости различий между двумя группами использовали t-критерий Стьюдента, при сравнении более чем двух групп применяли дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). В работе использованы современные фотометрические методы, вестерн-блот, высоко эффективная жидкостная хроматография с УФ-детекцией, адекватные цели и задачам исследования.

Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований со статистической обработкой результатов с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.

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 работы впервые показано разнонаправленное действие донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-

транспортера Р-гликопротеина в зависимости от концентрации и длительности воздействия.

Установлено, что снижение количества и активности Р-гликопротеина под действием донора оксида азота S-нитрозоглутатиона связано с повреждением его молекулы вследствие развития нитрозативного стресса.

Выявлено, что повышение относительного количества Р-gp при воздействии низких концентраций донора оксида азота S-нитрозоглутатиона реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при увеличении концентрации S-нитрозоглутатиона – через ядерный фактор эритроидного происхождения 2 и конститутивный андростановый рецептор.

Доказано, что прегнан X рецептор не участвует в регуляции Р-гликопротеина под действием донора оксида азота S-нитрозоглутатиона.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Результаты работы имеют важное практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике. Изменение активности Р-гликопротеина под действием донора NO расширяет представление об абсорбции веществ-субстратов белка-транспортера в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся нитрозативным стрессом (заболевания органов дыхания, нервной систем, желудочно-кишечного тракта), а также при их совместном назначении с лекарственными препаратами – донорами NO, например, нитратами, что, в свою очередь, повысит эффективность и безопасность проводимой фармакотерапии.

Ценность научных работ соискателя

Заключается в изучении механизмов влияния донора оксида S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина, так как совместное назначение лекарственных препаратов, которые являются донорами оксида азота (например, нитроглицерин, изосорбида динитрат, нитропруссид натрия), с лекарственными веществами-субстратами Р-гликопротеина с малой широтой терапевтического действия может привести к изменению возможных фармакокинетических межлекарственных взаимодействия на уровне данного

белка-транспортера.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена изучению влияния донора оксида S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина в условиях нитрозативного стресса *in vitro*. Она соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки России и индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных Scopus и Web of Science.

1. Влияние оксида азота на функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Щулькин А.В., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173. – № 1. – С. 38-42. – DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-1-38-42.

2. Механизмы регуляции функционирования белка-транспортёра Р-гликопротеина под действием оксида азота. Щулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Мыльников П.Ю., Якушева Е.Н. Биохимия. - 2022. Т. 87. - № 4. - С. 523-538. DOI: 10.31857/S0320972522040054.

3. Влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Сеидкулиева А.А., Щулькин А.В., Якушева Е.Н. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58. – № 5. – С. 410-420. – DOI: 10.31857/S0044452922050023.

Диссертация «Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro*» Судаковой Елены Александровны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании кафедр: биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО; фармакологии; фармацевтической химии; фармацевтической технологии; биологии; онкологии; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики; управления и экономики фармации; фармакогнозии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Присутствовало на заседании 24 человека профессорско-преподавательского состава. Результаты голосования: «за» - 24 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет (протокол № 2 от 19 декабря 2022 г.).

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

Якушева Елена Николаевна

Подпись профессора Якушевой Е.Н. заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор

Сущков Игорь Александрович

