

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной деятельности  
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава  
России

д.м.н., профессор

М.Е. Стаценко

2023 г.



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
о научно-практической значимости диссертации  
Судаковой Елены Александровны «Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro*»,  
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

#### Актуальность работы

Оксид азота (II) – эндогенная сигнальная молекула, регулирующая многочисленные процессы в организме человека. Физиологическая роль NO в клетке обусловлена его участием в регуляции тонуса сосудов, сократимости миокарда и скелетных мышц, тонуса бронхов и моторики ЖКТ. В качестве сигнальной молекулы NO модулирует процессы ангиогенеза и регенерации, ингибирует адгезию форменных элементов крови к эндотелию, является медиатором многих видов чувствительности, участвует в процессах высшей нервной деятельности, регулирует активность митохондрий и редокс-гомеостаз, является эффектором иммунных реакций. В настоящее время в эксперименте и клинике определены целые группы заболеваний, в развитии которых регистрируются выраженные изменения в обмене NO. Среди них, прежде всего, болезни сердечно-сосудистой системы, в том числе артериальная гипертензия, инфаркт миокарда, легочная гипертензия, атеросклероз, инсульты. Значительная роль отводится NO в патогенезе

нейродегенеративных заболеваний. Изменения активности NO-синтаз и генерации NO отмечены при аутоиммунных заболеваниях и диабете, остром и хроническом воспалении различных органов и тканей, онкологических заболеваниях, болезнях почек, легких и др.

В рамках представленной на рассмотрение диссертационной работы изучалось влияние NO на функционирование мембранного белка Р-гликопротеина. Р-гликопротеин относится к суперсемейству ABC-транспортеров и участвует в переносе широкого спектра субстратов через биологические мембраны. Данный транспортер играет важную роль в транспорте эндогенных молекул, например стероидных гормонов, фармакокинетике лекарственных веществ, а также участвует в развитии множественной лекарственной устойчивости опухолей.

В ряде исследований было оценено влияние доноров NO на количество и активность Р-гликопротеина. Однако данные работы не носили системного характера, в них были получены противоречивые результаты, а механизмы влияния NO на Р-гликопротеин и вовсе не изучались.

Все перечисленные выше обстоятельства указывают на то, что диссертационная работа Судаковой Е.А. является актуальной и представляет научный и практический интерес.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

В диссертационной работе Судаковой Е.А. впервые проведено комплексное изучение влияния донора NO S-нитрозоглутатиона на функционирование (активность и количество) белка-транспортера Р-гликопротеина, оценено его действие в зависимости от концентрации и длительности экспозиции. С использованием большого арсенала биохимических, аналитических, иммунохимических и молекулярно-биологических методов автором было показано, что снижение количества и активности Р-гликопротеина связано с развитием окислительного стресса.

Особым достоинством диссертационной работы является то, что с помощью применения специфических ингибиторов автором установлены механизмы повышения количества Р-гликопротеина под действием донора NO. В частности показано, что повышение относительного количества Р-гликопротеина при воздействии низких концентраций донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь и конститутивный андростановый рецептор, а при увеличении концентрации донора оксида азота (II) – через ядерный фактор эритроидного происхождения 2.

Полученные автором новые данные о механизмах регуляции функционирования Р-гликопротеина и сформулированные выводы обуславливают научную новизну диссертационной работы.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Результаты диссертационной работы Судаковой Е.А. вносят значительный вклад в существующую систему представлений о молекулярных механизмах регуляции Р-гликопротеина под действием NO. В частности выявлено, что высокие концентрации донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона вызывают развитие нитрозативного стресса и снижают количество и активность Р-гликопротеина. Низкие концентрации S-нитрозоглутатиона повышают количество транспортера действуя через NO-цГМФ-сигнальный путь и конститутивный андростановый рецептор, а при увеличении концентрации донора оксида азота (II) – через ядерный фактор эритроидного происхождения 2.

Клеточная линия Caco-2 используется как классическая *in vitro* модель для изучения абсорбции веществ в желудочно-кишечном тракте, а Р-гликопротеин является одним из основных факторов, препятствующих всасыванию ксенобиотиков из кишечника. Следовательно, полученные данные об изменении активности Р-гликопротеина под действием донора оксида азота можно использовать для прогнозирования всасывания

субстратов транспортера при заболеваниях, сопровождающихся развитием нитрозативного стресса, а также при их совместном назначении с лекарственными препаратами, которые являются донорами NO (например, нитроглицерин, изосорбида динитрат, нитропруссид натрия).

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

### **Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В работе был использован большой арсенал современных методов анализа, что в сочетании с адекватной статистической обработкой данных позволяет судить о достоверности полученных результатов. Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований, хорошо аргументированы и логически вытекают из представленных результатов. В исследовании использован большой объем современных литературных источников.

### **Характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Судаковой Е.А. построена традиционно, изложена на 113 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 188 источниками, из которых 27 отечественных и 161 зарубежных авторов. 43% источников опубликованы за последние 5 лет.

Тема диссертации соответствует заявленной научной специальности.

В обзоре литературы, анализируя современную информацию,

диссертант подробно описывает синтез оксида азота (II), его мультифункциональную роль и механизмы действия данной молекулы в физиологических и патофизиологических условиях. Большое внимание уделяется роли сигнального пути «оксид азота (II) – растворимая гуанилатциклаза – циклический гуанозинмонофосфат». Затем в этой главе повествуется о гиперпродукции оксида азота (II), и как следствие этого процесса, говорится о развитии нитрозативного стресса. Далее автор приводит примеры доноров оксида азота (II) и описывает их положительные и отрицательные эффекты.

Вторая часть обзора литературы посвящена белку-транспортеру Р-гликопротеину. Автор приводит исчерпывающую информацию о структуре, функциях и известных механизмах регуляции Р-гликопротеина. Особое внимание уделяется литературным данным о влиянии оксида азота (II) на функционирование белка-транспортера, однако механизмы регуляции данного процесса не установлены, что еще раз подтверждает актуальность диссертационного исследования.

В разделе материалы и методы представлены использованные современные биохимические, аналитические, иммунохимические и молекулярно-биологические методики, такие как: вестерн-блот, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофлуориметрия. Используемые в работе материалы и методы соответствуют цели и поставленным задачам. Примечательно, что для изучения механизмов влияния S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина была сформирована отдельная экспериментальная серия, где использовались ингибиторы растворимой гуанилатциклазы и изучаемых транскрипционных факторов (фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора, конститутивного андростанового рецептора), что, в свою очередь, подчеркивает полноту и адекватность представленных результатов. 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 главе результаты представлены полученные лично автором данные диссертационной работы, которые сопровождаются иллюстрациями в виде графиков и таблиц. На первом этапе исследования было установлено, что S-нитрозоглутатион во всех экспериментальных моделях повышал уровень метаболитов оксид азота, это свидетельствует об адекватности используемой модели. С увеличением времени воздействия и концентрации S-нитрозоглутатиона возрастал уровень маркеров нитрозативного стресса, что подтверждало его развитие и, в свою очередь, приводило к снижению жизнеспособности клеточной линии Caco-2.

На следующем этапе эксперимента было изучено влияние донора оксида азота (II) на относительное количество Р-гликопротеина. Установлено, что S-нитрозоглутатион в концентрациях 1-500 мкМ и длительностью воздействия 3 ч не влиял на количество Р-гликопротеина. S-нитрозоглутатион в диапазоне концентраций 10-100 мкМ при 24 ч инкубации и в концентрации 10 мкМ при 72 ч воздействии повышал уровень белка-транспортера, а в концентрации 500 мкМ при 24 ч экспозиции и в концентрациях 100 и 500 мкМ при 72 ч воздействии вызывал его снижение. Изменение количества Р-гликопротеина под действием донора оксида (II) азота S-нитрозоглутатиона сопровождались аналогичным по направленности изменением его активности.

На завершающем этапе эксперимента был оценен вклад растворимой гуанилатциклазы и транскрипционных факторов в механизмы повышения относительного количества белка-транспортера под действием донора оксида азота (II).

В разделе обсуждение соискатель интерпретирует собственные результаты исследования, сопоставляя их с современными литературными сведениями научных статей отечественных и зарубежных авторов по изучаемой проблеме.

Сформулированные выводы и практические рекомендации полностью отражают результаты работы, отличаются четкостью формулировок, научно

обоснованы, соответствуют задачам диссертационного исследования и опираются на достаточный для диссертационной работы фактический материал.

### **Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат полностью соответствует содержанию работы и оформлен согласно принятым требованиям.

### **Публикации результатов исследования в научных изданиях**

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, 3 из которых изданы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в базы Web of Science и Scopus. Результаты исследования обсуждены в рамках 10 российских и международных конференций.

### **Замечания и вопросы к диссертационной работе**

Существенных замечаний к изложенным в диссертации результатам, их интерпретации и сформулированным выводам не возникло. Однако, в работе встречаются стилистические и орфографические недочеты. Трудно согласиться с порядком и формой применения некоторых статистических критериев. В частности, **при ANOVA следует указывать достоверность действия «фактора», а критерий студента при анализе множественных сравнений требует введения поправки Бонферони.** Указанные неточности не влияют на общую положительную оценку и не подвергают сомнению полученные результаты диссертационной работы Судаковой Е.А.

В ходе обсуждения диссертации, хотелось бы получить ответы на ряд вопросов:

- 1. Почему при изучении механизмов регуляции Р-гликопротеина в клеточной линии Сасо-2 не блокировали NOS?**
- 2. Как объяснить снижение, зависимое от концентрации,**

небелковых тиоловых групп вызванное S-нитрозоглутатионом? Если полагать, что S-нитрозоглутатионом является внутриклеточным донором оксида азота, что некоторыми авторами подвергается сомнению (Broniowska KA, Diers AR, Hogg N. S-nitrosoglutathione. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1830(5):3173-81. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23416062; PMCID: PMC3679660), то концентрация небелковых сульфгидрильных групп, основным компонентом которых является глутатион, должна возрасти. Так же хотелось бы узнать мнение автора по поводу снижения белковых сульфгидрильных групп. Это результат S-нитрозилирования?

### Заключение

Диссертация Судаковой Елены Александровны на тему «Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro*» является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решена актуальная научная задача, направленная на изучение влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование белка-транспортера Р-гликопротеина и оценку роли нитрозативного стресса, циклического гуанозинмонофосфата-сигнального пути, ядерного фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в данном процессе, что имеет важное значение для биохимии.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Судаковой Елены Александровны соответствует пункту 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 автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских



наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, протокол №15 от 18.04.2023.

Заведующий кафедрой  
теоретической биохимии  
с курсом клинической биохимии  
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России  
доктор медицинских наук, профессор

Олег Владимирович Островский

Контактная информация:

400131, г. Волгоград

улица площадь Павших борцов, д. 1

Телефон: 8 (8442) 38-50-05

e-mail: [post@volgmed.ru](mailto:post@volgmed.ru)

Подпись д.м.н., проф. О.В.Островского ЗАВЕРЯЮ

Начальник управления кадров ВолгГМУ



*М. Р. Швецко*