

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, доцента
Покровской Татьяны Григорьевны
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 диссертационной работы

Диссертационная работа Судаковой Елены Александровны посвящена изучению механизмов регуляции белка-транспортера Р-гликопротеина. Р-гликопротеин представляет собой эффлюксный транспортер, отвечающий за выведение молекул эндо- и экзогенных веществ из клеток за счет расходования энергии АТФ. Экспрессируясь в опухолевых клетках, он обуславливает развитие их множественной лекарственной устойчивости, а локализуясь в мембране гепатоцитов, энтероцитов, почечном эпителии и эндотелии гистогематических барьеров, принимает участие в фармакокинетике лекарственных веществ – своих субстратов.

Активность данного транспортера может изменяться под воздействием ряда условий и факторов, что может привести к изменению чувствительности опухолей к проводимой терапии или возникновению фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

Таким образом, практически значимой задачей биохимии является изучение механизмов регуляции Р-гликопротеина с целью выявления путей направленной модуляции его функционирования.

Оксид азота (II) представляет собой эндогенную молекулу, регулирующую многочисленные физиологические процессы. Поэтому исследование механизмов влияния оксида азота (II) на Р-гликопротеин является целесообразным, а ее актуальность не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов, рекомендаций

Для реализации цели исследования, заключающейся в изучении влияния

донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина и оценке роли циклического гуанозинмонофосфат-сигнального пути, ядерного фактора эритроидного происхождения 2, прегнан Х рецептора и конститутивного андростанового рецептора в данном процессе, были поставлены, а затем успешно решены 7 научных задач.

В работе выполнено исчерпывающее количество экспериментов *in vitro*, в том числе с применением специфических ингибиторов транскрипционных факторов, а также использованы современные и информативные биохимические методики: вестерн блот, высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием, спектро- и флуориметрия.

Полученные данные статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ («Statsoft Statistica 13.0» и GraphPad Prism 8).

По итогам диссертационной работы сформулировано 7 выводов, которые соответствуют задачам исследования и отражают материалы диссертационного исследования. Автором также обоснованы практические рекомендации.

Таким образом, объем материала, современные методы биохимических исследований, проведенный статистический анализ не позволяют усомниться в обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертационной работе.

Достоверность и новизна исследований, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Дизайн исследования, тщательный анализ и статистическая обработка данных не вызывают сомнений в достоверности полученных результатов, на основании которых были сформулированы выводы и практические рекомендации.

В ходе исследования впервые были установлены механизмы влияния оксида азота (II) на Р-гликопротеин. Выявлено, что повышение относительного количества Р-гликопротеина при воздействии низких концентраций донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона реализуется через оксид азота (II) –

циклический гуанозинмонофосфат-сигнальный путь и конститутивный андростановый рецептор, а при увеличении концентрации S-нитрозоглутатиона – через ядерный фактор эритроидного происхождения 2.

Содержащиеся в работе данные получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах выполняемой работы: постановка цели, задач, выбор методов исследования, проведение экспериментов, статистическая обработка и анализ полученных результатов, написание статей, оформление диссертации. Авторский вклад в диссертационное исследование превышает 90%.

Основные положения и результаты исследования были доложены и обсуждены на региональных, всероссийских и международных научных форумах и конференциях. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 3 в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

В ходе исследования на клетках линии Caco-2 установлены механизмы разнонаправленного влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина. В частности, показано, что снижение количества и активности Р-гликопротеина связано с повреждением его молекулы вследствие развития нитрозативного стресса.

Повышение количества Р-гликопротеина при воздействии низких концентраций донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона реализуется через оксид азота (II) – циклический гуанозинмонофосфат-сигнальный путь и конститутивный андростановый рецептор, а при увеличении концентрации – через ядерный фактор эритроидного происхождения 2.

Выявленные сигнальные пути, участвующие в регуляции Р-гликопротеина, в дальнейшем могут быть использованы для направленной модуляции его функционирования.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, иллюстрирована 8 таблицами и 25 рисунками. В список литературы включено 188 источников, из них 161 – англоязычный, 81 – опубликованы в течение последних 5 лет, что указывает на использование диссертантом наиболее актуальных и современных данных.

Диссертация написана хорошим языком. Во введении дано обоснование актуальности темы, указаны цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы изложены современные представления о физиологической и патологической роли оксида азота (II); описание сигнального пути «оксид азота (II) – растворимая гуанилатциклаза – циклический гуанозинмонофосфат», опосредующего передачу сигналинга от оксида азота (II) в клетку; описывается развитие нитрозативного стресса при гиперпродукции оксида азота (II); приводятся примеры существующих и применяющихся в экспериментах доноров оксида азота (II) и дается обоснование выбора S-нитрозоглутатиона, как донора оксида азота (II) в проведенном исследовании. Затем описывается структура и функции Р-гликопротеина; приводятся основные механизмы его регуляции, в числе которых и изучаемые транскрипционные факторы.

Далее изложены материалы и методы, применяемые в исследовании. Работа выполнена *in vitro* на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Сасо-2). В исследовании в качестве донора оксида азота (II) использовали S-нитрозоглутатион в широком диапазоне концентраций и длительности воздействия. Автором подробно дается описание серий и используемых методов, позволяющих воспроизвести данные эксперименты в полном объеме.

В разделе результаты приведены данные биохимических исследований, далее следует их обсуждение.

Автором было показано, что S-нитрозоглутатион во всех исследуемых концентрациях и сроках экспозиции являлся донором оксида азота (II). При этом в концентрациях 100 и 500 мкМ при экспозиции 24 ч и в концентрациях 50-500 мкМ и экспозиции 72 ч он инициировал развитие нитрозативного стресса и вызывал снижение жизнеспособности клеток.

S-нитрозоглутатион при 24 ч инкубации в концентрациях 10-100 мкМ и при 72 ч экспозиции в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество Р-гликопротеина. Однако, при 24 ч воздействии донор NO в концентрации 500 мкМ и при 72 ч инкубации в концентрациях 100 и 500 мкМ снижал его уровень.

Изменение количества Р-гликопротеина сопровождалось аналогичным по направленности изменением активности белка-транспортера.

На заключительном этапе исследования были изучены механизмы повышения относительного количества белка-транспортера под действием оксида азота (II). Для этого были выполнены эксперименты с ингибитором растворимой гуанилатциклазы – 1Н-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН (ODQ), ингибитором ядерного фактора эритроидного происхождения 2 – N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (АЕМ1), с ингибиторами прегнанового X рецептора – кетоконазолом и конститутивного андростанового рецептора – 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-добензо[b,f]азепин-3-ил]этиловым эфиром карбаминовой кислоты (СINPA1), стимулирующих экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Р-гликопротеин.

В ходе исследования было установлено, что повышение относительного количества белка-транспортера Р-гликопротеина при воздействии низких концентраций донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона реализуется через оксид азота (II) – циклический гуанозинмонофосфат-сигнальный путь (10-50 мкМ) и конститутивный андростановый рецептор (10 мкМ), а при увеличении концентрации S-нитрозоглутатиона до 50-100 мкМ, развитии и прогрессировании нитрозативного стресса – через ядерный фактор эритроидного происхождения 2.

Достоинства и недостатки содержания и оформления диссертации

Диссертация оформлена согласно требованиям ГОСТ. Она представляет собой самостоятельно выполненную, завершённую научно-квалификационную работу, в которой получены новые сведения о влиянии донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование белка-транспортера Р-гликопротеина и установлены механизмы данного влияния.

Работа содержит достаточный для диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук объем исследований, позволяющий получить обоснованные и правомочные научные положения и выводы, отвечающие требованиям пунктов 1, 5, 10 и 13 паспорта научной специальности биохимия. Поставленные цель и задачи исследования в работе решены.

Результаты исследования достаточно отражены в рецензируемых научных журналах, представлены и обсуждены на научных форумах различного уровня.

В целом работа заслуживает положительной оценки. Однако, в качестве замечаний можно отметить ряд неудачных выражений, опечатки.

Основная концепция работы, положения, выносимые на защиту, а также полученные фактические данные не вызывают принципиальных возражений. При этом в порядке дискуссии хотелось уточнить некоторые вопросы:

1) Почему в качестве субстрата Р-гликопротеина был выбран фексофенадин?

2) Почему при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрации 100 мкМ и длительностью 24 ч происходило повышение количества Р-гликопротеина, но не повышалась его активность?

Заключение

Диссертация Судаковой Елены Александровны «Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач исследования влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-

гликопротеина и оценки роли циклического гуанозинмонофосфата-сигнального пути, ядерного фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в данном процессе.

По объему, степени достоверности результатов исследования, научной новизне, изложению и оформлению диссертация в полной мере 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 ее автор, Судакова Елена Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Белгородский государственный
национальный исследовательский университет»,
доктор медицинских наук
(14.03.06 фармакология и клиническая фармакология),
доцент

«03» мая 2023 г.

Покровская Татьяна Григорьевна



308015, г. Белгород, ул. Победы, д. 85
Тел.: +7(915)568-41-27
E-mail: pokrovskaja-tg@mail.ru