

## ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора кафедры биохимии и молекулярной биологии Института фармации и медицинской химии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации доктора медицинских наук, профессора Давыдова Вадима Вячеславовича 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 исследования**

Диссертационная работа Абаленихиной Ю.В. посвящена изучению содержания и функционирования белка-транспортера Р-гликопротеина (Pgp) в условиях моделирования окислительного стресса. Актуальность подобного исследования определяется тем, что Pgp выступает в роли важного фактора защиты клеток, обеспечивающего выведение из них различных веществ, среди которых многочисленны эндогенные метаболиты и лекарственные препараты-ксенобиотики.

Синтез и свойства гликопротеина Р могут существенно модулироваться под влиянием различных факторов внешней и внутренней среды. Особую роль при этом приобретает регуляция индукции синтеза данного белка за счет изменения скорости экспрессии гена лекарственной устойчивости. Последняя находится под контролем множества факторов, среди которых ядерный прегнан Х рецептор, конститутивный андростановый рецептор, фактор, индуцируемый гипоксией (HIF1 $\alpha$ ) и др.

Важную роль в контроле функционирования Pgp может иметь изменение структуры плазматической мембраны клетки в условиях формирования окислительного стресса, а также прямое воздействие на молекулу белка-переносчика активных форм кислорода и карбонильных продуктов метаболизма, усиленно образующихся при этом состоянии. Принимая во внимание тот факт, что окислительный стресс выступает в качестве неспецифического звена патогенеза многих заболеваний, изучение его влияния на свойства и синтез Р-гликопротеина, позволит раскрыть роль данного белка в молекулярном механизме их развития, а также оценить возможность использования для их терапии лекарственных препаратов, представляющих собой субстраты Pgp.

Вместе с тем, в современной литературе отсутствуют систематизированные сведения об особенностях регуляции свойств Pgp под действием прооксидантов и продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов. Все еще нет полной ясности в представлениях о роли транскрипционных факторов Nrf2, CAR, PXR, HIF1 $\alpha$  в индукции Р-

гликопротеина в условиях окислительного стресса. Принимая во внимание перспективность изучения подобных вопросов, автор четко обозначила цель диссертационного исследования – оценить функционирование мембранного белка-транспортера Pgp и роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 $\alpha$ , CAR и PXR в его регуляции в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*.

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

Диссертационное исследование Аболенихиной Ю.В. обладает высокой научной новизной. В нем установлен характер изменения активности и содержания Р-гликопротеина в условиях моделирования окислительного стресса эндогенной и экзогенной природы, а также описан тонкий механизм их возникновения.

Впервые показано, что при умеренном окислительном стрессе происходит повышение количества и активности Pgp, а при повышении его интенсивности – содержание белка-транспортера и его активность снижаются.

Автором впервые описан механизм повышения количества Pgp и установлены различия в регуляции его активности в зависимости от причины возникновения окислительного стресса. Приведены убедительные аргументы в пользу того, что при развитии окислительного стресса экзогенной природы доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1, а в условиях снижения уровня внутриклеточного антиоксиданта – глутатиона (эндогенная причина окислительного стресса), существенный вклад в регуляцию индукции Pgp вносят транскрипционные факторы Nrf2, HIF1 $\alpha$ , PXR, CAR.

Впервые показано, что в условиях окислительного стресса при индукции синтеза Pgp жизнеспособность клеток возрастает. Данный факт отражает защитную роль белка-транспортера в условиях окислительного стресса.

В диссертационном исследовании впервые использован инновационный подход к количественному определению малонового диальдегида в транспортной среде с применением метода ВЭЖХ МС/МС, что позволило адекватно оценить состояние транспорта данного метаболита при участии Pgp.

Впервые установлен ингибирующий эффект бутионинсульфоксимины и индуцирующее действие малонового диальдегида на Pgp, опосредованные эффектом транскрипционных факторов CAR и PXR.

### **Научная и практическая значимость полученных результатов**

Полученные в работе данные углубляют существующие представления о влиянии активных форм кислорода и антиоксидантов на функционирование Pgp. Результаты и сформулированные теоретические положения диссертационного исследования вносят существенный вклад в понимание механизмов регуляции функции белка-транспортера, опосредованные

транскрипционными факторами Nrf2, HIF1 $\alpha$ , PXR, CAR в условиях окислительного стресса.

Результаты диссертации имеют важное практическое значение. Так, автором было предложено использовать клетки линии Caco-2, обладающие основными свойствами энтероцитов тонкого кишечника, формирующих плотный клеточный монослой и экспрессирующих Pgp, для исследования процесса абсорбции лекарственных веществ *in vitro* и оценки вклада эффлюксного белка-транспортера в эти процессы.

Основные положения диссертационного исследования внедрены в учебный процесс и используются при обучении студентов на кафедрах биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО и фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Разработанные на основании проведенных экспериментальных исследований рационализаторские предложения внедрены в работу центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

#### **Общая оценка использованных методов, степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Подробный анализ отечественной и зарубежной литературы (всего 446 источников) позволил диссертанту получить объективное представление о состоянии изучаемой проблемы, а также определить цель и задачи исследования.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач был использован широкий спектр современных биохимических методов исследования. Внутриклеточный уровень АФК определялся с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H2 XRos. Уровень окислительного стресса оценивался фотометрическими методами по концентрации карбонильных производных белков, продуктов перекисного окисления липидов, белковых и небелковых SH-групп. Функциональная активность Pgp исследовалась в экспериментах *in vitro* по проникновению маркерного субстрата Pgp – фексофенадина через бислойную липидную мембрану клеток. Концентрация фексофенадина определялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Абсолютное содержание Pgp, Nrf2 и глутатионпероксидазы оценивалось при помощи метода гетерогенного иммуноферментного анализа. Относительный уровень Pgp и транскрипционных факторов HIF1 $\alpha$ , CAR, PXR анализировался методом вестерн-блот. Определение концентрации МДА в транспортной среде выполнялось с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС. Для изучения механизмов влияния экзогенного и эндогенного ОС на количество Pgp в клетках линии Caco-2 использовались селективные ингибиторы транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 $\alpha$ , CAR, PXR.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе, определяется высоким

методическим уровнем исследований. Поставленные цель и задачи реализованы за счет корректного построения модели и использования адекватных методов исследования.

Достоверность научных положений и выводов, а также степень их обоснованности в полной мере подтверждается данными статистической обработки и сомнения не вызывает.

Выводы корректны. Они логично вытекают из полученных результатов и их научной трактовки и полностью соответствуют сформулированным задачам. Практические рекомендации опираются на данные диссертационного исследования.

### **Содержание работы, ее завершенность и оформление**

Диссертационная работа построена традиционно. Она состоит из введения, обзора литературы, глав материалов и методов исследований, результатов исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы, включающего 446 источников. Диссертация изложена на 262 страницах машинописного текста, иллюстрирована 30 таблицами и 75 рисунками.

Во введении автор последовательно и подробно раскрывает актуальность темы исследования, формулирует его цель и задачи, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методы исследования, представляет основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и сведения об апробации полученных результатов. В дополнение к тому, в этом разделе представлена информация о личном вкладе автора, ее публикациях по теме исследования, об объеме и структуре диссертации.

В обзоре литературы автор квалифицированно излагает современные представления о структуре, локализации, основных функциях, субстратной специфичности и модуляторах функционирования Р-гликопротеина, механизмах формирования окислительного стресса, влиянии активных форм кислорода на белки и липиды, а также подвергает анализу существующие литературные данные о влиянии окислительного стресса на содержание Pgp в клетках. Стиль изложения и характер анализируемых литературных источников отражают высокий уровень научной эрудиции диссертанта.

Глава «Материалы и методы исследования» посвящена описанию методологии, характеристике объекта и использованных методов исследований. В ней подробно описываются биохимические методы, использование которых позволило диссертанту адекватно подойти к решению поставленных в работе задач, а также методы статистического анализа полученных результатов.

Результаты собственных исследований представлены в 3 главе. Здесь автор детально описывает результаты тестирования использованных моделей окислительного стресса, а также особенности влияния экзогенного и эндогенного окислительного стресса на содержание и активность Р-

гликопротеина. Особое место в 3 главе уделено изложению результатов, посвященных выяснению роли ряда транскрипционных факторов в изменении количества Pgr в условиях *in vitro* при эндогенном и экзогенном окислительном стрессе, а также данных, касающихся трансмембранного транспорта P-гликопротеином промежуточного продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида (МДА) и участия последнего в регуляции активности Pgr.

В Главе 4 автор проводит всестороннее обсуждение полученных результатов с учетом данных современной периодической литературы. На основании обсуждения сформулированы 9 выводов. Выводы основаны на достоверном фактическом материале, подвергнутом адекватной статистической обработке, логически вытекают из представленных в работе результатов и в полной мере соответствуют поставленным задачам.

В соответствующих разделах диссертации излагаются рекомендации для возможного практического использования полученных результатов и определяются основные перспективы дальнейшего развития экспериментальных исследований в данном направлении.

#### **Подтверждение опубликования результатов диссертации в научных изданиях**

По материалам диссертации опубликовано 48 публикаций, из которых 16 статей – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и 13 – в изданиях, входящих в международную библиографическую базу данных Scopus, а также получено 3 патента на изобретения.

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

Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертации.

#### **Замечания по диссертационной работе**

При написании диссертации автор использовала не общепринятые в биохимической литературе термины – «экзогенный» и «эндогенный» окислительный стресс. Окислительный стресс, представляет собой состояние, которое обусловлено дисбалансом прооксидантной и антиоксидантной системы. Причины его могут быть разные – экзогенные, связанные с эффектом внешних факторов, ограничивающих функционирование компонентов антиоксидантной системы, или усиливающих прооксидантные процессы в тканях, или эндогенные, связанные с аналогичными эффектами, но возникающие под действием каких-либо внутренних факторов (таких как тканевая гипоксия, секреция адреналина и др.). Для моделирования окислительного стресса, диссертант использовала только внешние факторы, которые вводились в среду (перекись водорода и бутионинсульфоксимин). При этом перекись водорода проявляла свойства прооксиданта, а бутионинсульфоксимин, по подтвержденным

данным диссертанта, угнетал синтез антиоксиданта глутатиона. Однако не исключено, что бутионинсульфоксимин проявлял прямое прооксидантное действие. Поэтому окислительный стресс, который возникал при его введении в исследуемую пробу можно определить, как экзогенный.

При этом к соискателю возникает вопрос:

1. А не может ли бутионинсульфоксимин оказывать прямое прооксидантное действие? Известны ли Вам данные литературы по этому вопросу?

Требуют пояснения диссертантом и еще ряд вопросов:

2. Как Вы можете объяснить защитную роль Р-гликопротеина в развитии окислительного стресса?

3. Анализируя изменение уровня МДА в клетках Вы указываете, что «...транспорт малонового диальдегида уменьшается, так как, видимо, увеличивается его транспорт путем пассивной диффузии». Но, может ли малоновый диальдегид путем пассивной диффузии проходить через липидный бислой клеточной мембраны, если его молекула достаточно гидрофильна? А не связано ли возникновение подобного сдвига с ускорением процессов катаболизма МДА в клетке?

4. Насколько корректно оценивать уровень глутатиона по содержанию SH-групп? Ведь глутатион может находиться не только в восстановленном, но и в окисленном состоянии. При этом внутриклеточный пул данного метаболита определяется суммой обеих его форм. Поэтому оценивая уровень восстановленного глутатиона, даже при помощи использованного достаточно неспецифического метода, вряд ли можно утверждать, что эндогенном окислительном стрессе содержание глутатиона в клетках снижалось. Для функционирования глутатионовой системы не менее важное значение приобретает именно ее восстановленность, а не абсолютное содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона. Поэтому при оценке антиоксидантных свойств системы глутатиона более корректно было бы определять уровень ее восстановленности.

5. В работе рассматривается возможная сигнальная роль малонового диальдегида, как медиатора окислительного стресса. Но почему внимание автора привлек именно этот карбонильный продукт свободно-радикального окисления липидов? В процессе окислительного стресса образуется достаточно широкий спектр карбонильных продуктов метаболизма (4-гидроксиалкены, акролеин, глиоксаль и многие другие), зачастую в значительно больших количествах, чем МДА. Более того, уже достаточно давно в литературе высказывалось мнение о том, что карбонильные продукты метаболизма выступают в роли медиаторов повреждающего эффекта окислительного стресса (H.Uchida, 2001).

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Возникающие вопросы к изложенным в диссертации материалам ни в коей мере не снижают ее высокой научно-практической ценности. Более того, они указывают на возможные перспективы продолжения исследований в данном направлении.

## Заключение

Диссертационная работа Абаленихиной Юлии Владимировны на тему: «Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*» выполнена на высоком методическом и научном уровне с использованием целого комплекса современных методов исследований, на большом фактическом материале, подвергнутом адекватной статистической обработке, что позволило диссертанту сделать корректные и обоснованные выводы и рекомендации к практическому использованию полученных результатов.

Работа является самостоятельным научным исследованием, на основании которого сформулированы и обоснованы теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, вносящее крупный вклад в медицинскую науку, связанное с выяснением защитной роли Р-гликопротеина в условиях нарушений метаболизма в клетках при окислительном стрессе и возможности его направленной модуляции с целью изменения лекарственной устойчивости и повышения эффективности химиотерапии.

По актуальности, методологии, объему выполненных исследований, содержанию, научной новизне, достоверности и значимости полученных результатов диссертационная работа Абаленихиной Юлии Владимировны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), предъявляемых к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

### Официальный оппонент:

доктор медицинских наук (03.01.04 – Биохимия)  
профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной  
биологии Института фармации и медицинской химии  
ФГАОУ ВО «Российский национальный  
исследовательский медицинский университет  
имени Н.И.Пирогова» Минздрава России  
«21» апреля 2023 г.



Давыдов В.В.

Подпись д.м.н., профессора В.В. Давыдова заверяю:

Ученый секретарь ученого Совета  
ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»  
Минздрава России,  
к.м.н., доцент  
«21» апреля 2023 г.



Демина О.М.

Контактная информация:

Давыдов Вадим Вячеславович, д.м.н., профессор  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1  
Тел.: 8(985) 044-63-02  
E-mail: vaddavydov@mail.ru