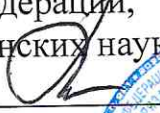



УТВЕРЖДАЮ

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  Р.Е. Калинин
« 10 »  2023 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация Абаленихиной Юлии Владимировны «Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*» выполнена на кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, фармакологии, лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В период подготовки диссертации соискатель Абаленихина Юлия Владимировна работала в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО в должности доцента.

В 2011 году окончила с отличием Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина» по специальности «Биология с дополнительной специальностью».

В 2015 году защитила кандидатскую диссертацию на тему «Окислительная модификация белков и лизосомальный цистеиновый протеолиз иммунокомпетентных органов крыс в условиях модулирования синтеза оксида азота» по специальности «Биохимия».

Работает 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 доцента.

Научный консультант – Якушева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Оценка выполненной соискателем работы

Молекулы биологически активных веществ проходят через клеточные мембраны не только пассивной диффузией, но и с помощью транспортных систем, связанных с белками-переносчиками. Одной из основных групп таких белков является суперсемейство ABC-транспортёров (англ.: ATP-binding cassette), к которому относится более сотни транспортных систем, обнаруженных как у бактерий, так и у человека. Важнейшим представителем суперсемейства ABC-транспортёров, участвующим в эффлюксе биобiotиков и ксенобиотиков, является Р-гликопротеин (Pgp).

Pgp – это белок, характеризующийся низкой субстратной специфичностью, так

как он способен распознавать широкий спектр веществ, включающий эндогенные лиганды, такие как цитокины, гормоны коры надпочечников, билирубин, фосфолипиды, а также лекарственные вещества: антиаритмики, антигистаминные препараты, статины, ингибиторы протеазы ВИЧ, бета-блокаторы, противоопухолевые препараты, некоторые психотропные средства, дигоксин и его метаболиты. Активность Pgp может значительно изменяться под влиянием факторов внешней и внутренней среды, таких как генетические особенности организма, концентрация кислорода в крови, кислотно-щелочной баланс, использование ряда лекарственных веществ.

Согласно современным представлениям, активность Pgp может изменяться при модуляции экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (*MDR1*, англ.: multidrug resistance gene) и активности синтезированного белка. При этом активность Pgp может как понижаться (ингибирование), так и повышаться (индукция). Ключевую роль в регуляции активности Pgp играет уровень экспрессии гена *MDR1* и изменение активности уже синтезированного белка. Экспрессия гена *MDR1* инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора, называемого «MDR1 enhanceosome». Ядерный pregnane X рецептор (PXR, англ.: pregnane X receptor) представляет собой белковый транскрипционный фактор, распознающий специфические последовательности в промоторах или энхансерах генов-мишеней и модулирующий их экспрессию. Данный транскрипционный фактор рассматривается как сенсор ксенобиотиков, оказывающий регулирующее воздействие на транскрипцию генов транспортеров лекарственных средств (в том числе Pgp), а также ключевых ферментов метаболизма. Аналогичную функцию выполняет и конститутивный андростановый рецептор (CAR, англ.: constitutive androstane receptor). Показано, что CAR и PXR могут связываться с респонсивным элементом ядерного рецептора в области 7.8 пар килобаз энхансера гена *MDR1* и активируют его экспрессию через DR4 мотив, с которым данные рецепторы взаимодействуют в качестве гетеродимера с рецептором ретиноевой кислоты или в качестве мономера.

Активность Pgp может изменяться в результате непосредственного взаимодействия молекулы белка-транспортера с молекулами эндогенных и экзогенных веществ.

Исследования, проведенные в 60–80-х гг. XX века показали, что повышенная продукция активных форм кислорода (АФК) играет важную роль в патогенезе наиболее распространенных заболеваний человека (патология сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной систем, злокачественные новообразования). Кроме того, было обосновано представление о биологической роли АФК в нормальных условиях, играя существенную роль в различных сторонах ее жизнедеятельности.

Ингибирование компонентов антиоксидантной системы способствует эндогенному синтезу АФК - эндогенный ОС, а воздействие прооксидантов инициирует развитие экзогенного окислительного стресса. Так как Pgp экспрессируется преимущественно в цитоплазматических мембранах, то можно предположить, что активация свободно-радикального окисления приведет к изменению функционирования данного белка-транспортера. Возможно, что при экзогенном ОС повреждение мембраны является более активным процессом, чем при эндогенном, и, следовательно, этиология развития ОС имеет важное значение в изучении регуляции активности и функционирования Pgp, локализованного в клеточной мембране.

Поэтому изучение влияния ОС на активность данного белка-транспортера, а также выявление механизмов его регуляции в условиях ОС позволит оценить роль Pgp в течении патологического процесса, более полно представить патогенез моделируемых нарушений и научно обосновать рациональные методы терапии.

**Личное участие соискателя в получении результатов,
изложенных в диссертации**

Автором самостоятельно подготовлен аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме, составлена программа исследования, проведены эксперименты *in vitro*, биохимические исследования, разработаны методы вестерн-блот и ВЭЖХ,

выполнена обработка и интерпретация данных, подготовка публикаций по диссертационной работе.

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

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных на иммортализованной клеточной линии Caco-2 (закупленной в ИНЦ РАН) и на современном аналитическом оборудовании, с применением адекватных и информативных биохимических методик, и реактивов, обладающими необходимыми паспортами качества.

Компьютерная и математическая обработка полученных данных выполнения с использованием лицензионного программного обеспечения и адекватных статистических критериев: программы «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.

Общие подходы к оценке активности Pgp соответствуют международным рекомендациям (FDA и EMA) и рекомендациям Международного консорциума по изучению транспортеров (International Transporter Consortium).

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, что:

1. При развитии эустресса, вызванного воздействием H_2O_2 и DL-бутионинсульфоксимином (БСО) происходит повышение количества и активности Pgp, при возникновении дистресса, напротив, количество и активность белка-транспортера снижаются.

2. БСО является ингибитором Pgp с IC_{50} (концентрация, ингибирующая

активность Pgr на 50%) $17,21 \pm 2,46$ мкМ.

3. В механизмах повышения количества Pgr при развитии экзогенного ОС, вызванного H_2O_2 , доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1; HIF1 α и CAR также принимают участие в данном процессе. PXR не оказывает существенного влияния на регуляцию белка-транспортера при экзогенном ОС.

4. При моделировании эндогенного ОС с помощью ингибитора синтеза глутатиона - БСО, все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути (Nrf2-keap1, HIF1 α , PXR, CAR) вносят вклад в индукцию Pgr.

5. Малоновый диальдегид в концентрации 10 мкМ может транспортироваться Pgr.

6. Малоновый диальдегид, являясь сигнальной молекулой, повышает относительное количество и активность Pgr, действуя через транскрипционные факторы CAR и PXR.

7. Индукция Pgr при развитии ОС имеет защитную функцию и способствует увеличению выживаемости клеток.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Полученные результаты имеют практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике. Выявленное в нашем исследовании снижение активности Pgr и повышение проницаемости монослоя клеток для субстрата белка-транспортера фексофенадина при развитии ОС может свидетельствовать о повышении абсорбции веществ-субстратов Pgr в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся ОС, что в свою очередь может приводить к увеличению их концентрации в плазме крови и сопровождаться развитием побочных эффектов фармакотерапии.

Ценность научных работ соискателя

Заключается в изучении механизмов регуляции Pgr в условиях экзогенного и эндогенного стресса. Полученные результаты демонстрируют повышение количества и активности Pgr в клетках линии Caco-2 на фоне моделирования

окислительного стресса создают предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов данного транспортера при фармакотерапии заболеваний, протекающих на фоне окислительного стресса. Полученные результаты относительно ингибирующей способности БСО могут использоваться в комплексной терапии онкологических заболеваний и будут способствовать потенцированию противоопухолевого эффекта, что следует подтвердить в экспериментах *in vivo*. Ингибирующее действие БСО в ткани опухолей приведет к снижению множественной лекарственной устойчивости, опосредованной гиперфункцией Pgp, и повышению эффективности химиотерапии.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена изучению механизмов влияния экзогенного и эндогенного окислительного стресса на количество и функционирование Р-гликопротеина *in vitro*. Она соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 48 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 16 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 13 – в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных, получено 3 патента РФ на изобретение.

1. Дозозависимое влияние пероксида водорода на уровень транскрипционного фактора Nrf2 *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, П.Д. Ерохина, И.В. Черных, Е.Н. Якушева. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2020. - Т. 23, № 10. - С. 12-17.

2. The Effect of Oxidative Stress on the Transport of the P-Glycoprotein Substrate through the Cell Monolayer / A.V. Shchulkin, Yu.V. Abalenikhina, Seidkulieva A.A., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. - 2021. - Vol. 15, No. 3, pp. 257–269. (Шулькин А.В.,

Абаленихина Ю.В., Сеидкулиева А.А., Черных И.В., Якушева Е.Н. Влияние окислительного стресса на транспорт субстрата Р-гликопротеина через клеточный монослой. Биологические мембраны. 2021. - Т. 38, № 4.- С. 292-305.)

3. Белок множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеин в условиях ингибирования синтеза глутатиона *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, А.А. Сеидкулиева, М.О. Порошина, Е.А. Судакова, Е.Н. Якушева // Технологии живых систем. - 2021. - Т. 18, № 3. - С. 43-51.

4. The role of P-glycoprotein in decreasing cell membranes permeability during oxidative stress / A.V. Shchulkin, Yu.V. Abalenikhina, P.D. Erokhina, I.V. Chernykh, E. N. Yakusheva // Biochemistry (Moscow). – 2021. - Vol. 86, No. 2. - pp. 197-206 DOI: 10.1134/S0006297921020085 (Роль Р-гликопротеина в ограничении проницаемости клеточных мембран при окислительном стрессе / А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, И.В. Черных, П.Д. Ерохина, Е.Н. Якушева // Биохимия. - 2021. - Т. 86, № 2. - С. 236-247.)

5. Induction of the of the constitutive androstane receptor during of the development of oxidative stress/ A.V. Shchulkin, Yu.V. Abalenikhina, A.A. Seidkulieva, A.N. Ryabkov, E.N. Yakusheva // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. - Vol. 171, No. 5. – pp. 615-618. (Индукция конститутивного андростанового рецептора при развитии окислительного стресса / А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, А.А. Сеидкулиева, Рябков А.Н., Якушева Е.Н. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2021. - Т. 171, № 5. - С. 588-591).

6. Functioning of the pregnan X receptor under oxidative stress / Y.V. Abalenikhina, E.A. Sudakova, A.A. Slepnev, A.A. Seidkulieva, P.D. Erokhina, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. 2022. Т. 16. № 1. С. 21-28. (Функционирование прегнан Х рецептора в условиях окислительного стресса / Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Слепнев, А.А. Сеидкулиева, П.Д. Ерохина, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева // Биологические мембраны. – 2022. – Т.39, № 2. – С. 107-115.).

7. Regulation and role of hypoxia-induced factor 1 α (HIF-1 α) under conditions

of endogenous oxidative stress *in vitro* / Yu. V. Abalenikhina, P.Yu. Myl'nikov, A. V. Shchul'kin, I. V. Chernykh, and E. N. Yakusheva // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022. - Vol. 173, No. 3 – С. 312-316. (Абаленихина Ю.В., Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Черных И.В., Якушева Е.Н. Регуляция и роль фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1 α), в условиях эндогенного окислительного стресса *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2022. - Т. 173, № 3. - С. 301-306.).

8. Functioning of the P-glycoprotein membrane transport protein under conditions of the inhibition of glutathione synthesis / Y.V. Abalenikhina, P.D. Erokhina, P.Y. Mylnikov, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva // *Applied Biochemistry and Microbiology*. - 2022. - Vol. 58, № 3. - С. 232-242. (Функционирование мембранного белка-транспортера Р-гликопротеина в условиях ингибирования синтеза глутатиона / Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева // Прикладная биохимия и микробиология. - 2022. - Т. 58, № 3. - С. 232-243.)

9. Разработка и валидация методики количественного определения малонового диальдегида методом ВЭЖХ-МС/МС / П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, Е.Н. Якушева // *Клиническая лабораторная диагностика*. - 2022. - Т. 67, № 7. - С. 369-373.

10. Регуляция конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Сасо-2 при моделировании окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, А.А. Сеидкулиева, С.К. Правкин, Е.Н. Якушева // *Биомедицинская химия*. – 2022. – Т. 68, № 4. - С. 297-301.

11. Внутриклеточная локализация и функция ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* / Ю. В.Абаленихина, П. Д. Ерохина, А. А. Сеидкулиева, О. А. Завьялова, А. В. Шулькин, Е. Н. Якушева // *Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова*. – 2022. – Т. 30, № 3. – С. 295 – 304.

12. Ингибирующее действие DL-бутионинсульфоксимида на активность Р-гликопротеина *in vitro* / Абаленихина Ю.В., Мыльников П.Ю., Шулькин А.В.,

Якушева Е.Н. // Казанский медицинский журнал. – 2022. – Т.103, № 5. – С. 780-787.

13. Механизмы регуляции Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro* / Ю. В. Абаленихина, А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников, Е. Д. Рокунов, Е. Н. Якушева // Acta naturae. – 2022. - Том 14 № 3 (54). С. 69-78. Mechanisms of P-Glycoprotein Regulation Under Exogenous and Endogenous Oxidative Stress *In Vitro*. / Yu. V. Abalenikhina, A. V. Shchulkin, P. Yu. Mylnikov, E. D. Rokunov, E. N. Yakusheva // Acta naturae. – 2022. - Vol. 14, № 3 (54). – С. 38-47.

14. Оценка принадлежности малонового диальдегида к модуляторам и субстратам белка-транспортера Р-гликопротеина / А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, П.Ю. Мыльников, И.В. Черных, Е.Н. Якушева// Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни. – 2022. – Т. 507. – С. 465-474. (Assessment of Malondialdehyde Belonging to Modulators and Substrates of the P-Glycoprotein Transporter Protein / A.V. Shchulkin, Yu.V. Abalenikhina, P.Y. Mylnikov, I.V. Chernykha, E. N. Yakusheva // Doklady Biochemistry and Biophysics, 2022, Vol. 507, pp. 247–255.)

15. Моделирование и динамика развития экзогенного и эндогенного окислительного стресса / Ю.В. Абаленихина, С.К. Правкин, А.В. Щулькин, Е.Д. Рокунов, Д.С. Немтинов, Е.П. Васильева, Е.Н. Якушева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25, № 12. - С. 10-17.

16. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ / Щулькин А.В., Транова Ю.С., Абаленихина Ю.В., Есенина А.С., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – Т.10, № 206. – С. 63-69.

17. Щулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Ерохина П.Д., Сеидкулиева А.А., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Способ повышения количества конститутивного андростанового рецептора. Патент на изобретение 2755507 С1, 16.09.2021. Заявка № 2021105606 от 04.03.2021.

18. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Слепнев А.А., Щулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Способ повышения количества прегнан Х рецептора.

Патент на изобретение 2762853 от 23.12.2021.

19. Абаленихина Ю.В., Ерохина П.Д., Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Способ ингибирования гликопротеина-R в эксперименте *in vitro*. Патент на изобретение 2779177 от 05.09.2022.

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

Заключение принято на совместном заседании центральной научно-исследовательской лаборатории, кафедр: фармакологии; биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО; нормальной физиологии с курсом психофизиологии; фармацевтической химии; фармацевтической технологии; биологии; онкологии; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики; управления и экономики фармации; фармакогнозии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Присутствовало на заседании профессорско-преподавательского состава 27 человек. Результаты голосования «за» - 27 человек; «против» – нет; «воздержались» – нет (протокол № 1 от 19 декабря 2022 г.).

Председатель межкафедрального совещания,
профессор кафедры фармакологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., доцент

Щулькин Алексей Владимирович

Подпись профессора Шулькина А.В. заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор



Сучков Игорь Александрович