

ОТЗЫВ

официального оппонента, заведующего кафедрой Биохимии имени Р.И. Лифшица, ведущего научного сотрудника центральной научно-исследовательской лаборатории Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации доктора медицинских наук, доцента Сеницкого Антона Ивановича 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

Актуальность проведенного исследования обоснована важной ролью мембранного белка-транспортера Р-гликопротеина (Рgp) в патогенезе, фармакотерапии и профилактике онкологических и неврологических заболеваний, которые сопровождаются развитием окислительного стресса (ОС). Рgp характеризуется вариабельностью функциональной активности, которая может изменяться под действием различных ксенобиотиков, а также факторов внешней и внутренней среды. Тем не менее, особенности регуляции функционирования транспортера под действием прооксидантов, а также продуктов ОС белкового и липидного происхождения до конца не выяснены: результаты основных исследований по данному вопросу получены *in vitro* с применением узкого диапазона концентраций, коротких сроков воздействия прооксидантов, а также не отражают механизмы регуляции и роль Рgp.

В связи с вышеизложенным, автором была сформулирована цель - оценить функционирование мембранного белка-транспортера Рgp и роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в его регуляции в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*, актуальность которой не вызывает сомнений.

Для реализации поставленной цели Абаленихина Ю.В. ставит перед собой 9 задач: воспроизвести модели экзогенного и эндогенного окислительного стресса, оценить количество и активность Рgp при изучаемых экспериментальных условиях, исследовать принадлежность

бутионинсульфоксимины к модуляторам активности Pgp, изучить роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF, CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при экзогенном и эндогенном окислительном стрессе, исследовать принадлежность малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности Pgp, а также оценить роль Pgp в выживаемости клеток при развитии окислительного стресса.

Успешное решение в ходе выполнения работы всех поставленных перед диссертантом задач позволили реализовать цель исследования и дать обоснованные выводы.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Представленное диссертационное исследование отличается высокой степенью научной новизны, что обусловлено примененным автором систематизированным методическим подходом, позволившем впервые охарактеризовать изменение функционирования Pgp в условиях ОС экзогенной и эндогенной природы.

Стоит отметить, что при решении поставленных задач автором был использован широкий спектр биохимических методик, что позволило провести детальный анализ и воспроизвести логическую цепочку событий в клетке.

Существенным преимуществом работы является то, что наряду с количественной оценкой уровня Pgp, определяемой методом ИФА и вестерн-блот, был проведен анализ изменения функциональной активности белка-транспортера методом ВЭЖХ с УФ детектированием.

В представленной работе впервые продемонстрировано, что при развитии эустресса, вызванного воздействием H_2O_2 и бутионинсульфоксимином происходит повышение количества и активности Pgp, при возникновении дистресса - количество и активность белка-транспортера снижаются. Автором установлено, что при развитии экзогенного окислительного стресса, вызванного H_2O_2 , доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1; HIF и CAR также принимают участие в данном процессе, а при эндогенном окислительном стрессе вклад вносит еще и PXR. Значительный интерес представляет впервые описанная автором защитная функция Pgp при развитии ОС, что подтверждалось в работе увеличением выживаемости клеток за счет эффлюкса малонового диальдегида из клетки.

Важным и перспективным для дальнейшего изучения и применения представляется выявленный автором факт, что бутионинсульфоксимин является ингибитором Pgp.

Таким образом, в ходе работы было получено значительное количество оригинальных данных, степень новизны которых подтверждает высокую научную ценность диссертационной работы Абаленихиной Ю.В.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Представленные в диссертации Абаленихиной Ю.В. научные положения, выводы и рекомендации являются обоснованными и полностью соответствуют цели и задачам исследования.

Исследование выполнено на культуре клеток Caco-2, которая признана надежным инструментом для прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ. Используются адекватные и верифицированные экспериментальные модели окислительного стресса. Важно отметить, что во всех сериях экспериментах приводятся и обсуждаются полученные в ходе исследования показатели, подтверждающие развитие окислительного стресса и его влияния на количество и активность Pgp.

Для получения результатов в исследовании использовались современные биохимические методы, в том числе ВЭЖХ МС/МС, вестерн-блот, иммуноферментный анализ, спектрофлуориметрия.

Достоверность полученных данных и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается применением современных методов статистического анализа и компьютерных программ.

Стоит отметить и значительный уровень апробации результатов исследования, которые были представлены в докладах на 24 конференциях, в том числе международного уровня. Важно отметить, что результаты были доложены на VII съезде биохимиков России (Сочи, 2021), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2022), 45-ом конгрессе Европейских Биохимических Обществ (FEBS) «Molecules of Life: towards new horizons» (Ljubljana, 2021).

Научная и практическая значимость полученных результатов

В ходе исследования установлено, что повышение количества и

активности Pgp в клетках линии Сасо-2 на фоне моделирования умеренного экзогенного и эндогенного окислительного стресса создают предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов данного транспортера при фармакотерапии заболеваний, протекающих на фоне окислительного стресса. При этом показано, что в условиях дистресса белок-транспортер не стоит рассматривать в качестве фармакологической мишени. В работе установлены пути регуляции активности Pgp, что может использоваться в целях повышения или снижения функционирования белка-транспортера через транскрипционные факторы Nrf, HIF, CAR при экзогенном воздействии прооксиданта, Nrf, HIF, CAR и PXR при дефиците внутриклеточных антиоксидантных ферментов.

Разработанная и валидированная методика количественного анализа МДА методом ВЭЖХ-МС/МС может быть рекомендована для оценки выраженности окислительного стресса, так как отличается большей чувствительностью по сравнению с фотометрическими методами. Выявленное свойство БСО ингибировать активность Pgp может быть использовано для снижения активности белка-транспортера при разработке методов терапии множественной лекарственной устойчивости.

Содержание работы, ее оформление и завершенность

Диссертационная работа Абаленихиной Ю.В. написана по традиционному плану, соответствующему требованиям действующих нормативных документов.

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы (446 источника), иллюстрирована 30 таблицами и 75 рисунками. Общий объем рукописи составляет 249 страниц. Материал изложен четко и логично.

Введение диссертационной работы включает в себя все регламентированные ГОСТ 7.0.11-2011 основные структурные элементы. В данном разделе автором последовательно и достаточно подробно раскрыты актуальность темы исследования и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, представлены основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов. Раздел содержит сведения о

личном вкладе автора, о публикациях по теме исследования, об объеме и структуре диссертации.

В первой главе (обзор литературы) автор квалифицированно представляет известные на данный момент сведения о структуре, локализации, основных функциях, субстратной специфичности и модуляторах функционирования Р-гликопротеина, теории окислительного стресса, влияние активных форм кислорода на белки и липиды, а также проанализированы литературные данные по вопросу влияния окислительного стресса на количество Р_{gr}. Стиль изложения, количество и набор проанализированных источников свидетельствуют о достаточной степени погруженности в проблему.

Глава «Материалы и методы исследования» в полной мере отражает адекватность объекта, методологии и методов исследования его целям и задачам. Подробно описываются примененные в исследовании современные биохимические методы.

Результаты исследования, приведенные в главе 3, в целом соответствуют цели работы и сгруппированы в соответствии с задачами. Значительное количество полученных автором собственных результатов в достаточной мере проиллюстрировано таблицами, графиками и фотографиями, что позволяет получить консолидированное представление о проделанной работе.

В ходе исследования было установлено, что в условиях умеренного экзогенного и эндогенного окислительного стресса количество и активность Р_{gr} возрастает, а при усугублении стресса – снижается.

На основании полученных результатов авторами было доказано, что бутионинсульфоксимин является прямым ингибитором Р_{gr} при кратковременном воздействии ксенобиотика.

Проведение экспериментов с использованием ингибиторов транскрипционных факторов позволили предположить, что Nrf2, NIF и CAR вносят существенный вклад в регуляцию функционирования Р_{gr} в условиях экзогенного стресса, а PXR и в условиях эндогенного окислительного стресса.

С помощью разработанной и валидированной методики ВЭЖХ МС/МС установлено, малоновый диальдегид является субстратом Р_{gr} и транспортируется им в клетках линии Сасо-2 при концентрации 10 мкМ. Метод вестерн-блот позволил выявить увеличение количества Р_{gr} при концентрациях малонового диальдегида 10 и 50 мкМ и длительности

экспозиции 24 ч, что указывает на его сигнальную функцию.

При обсуждении результатов (глава 4) автор проводит сопоставление полученных в исследовании данных с отраженным в литературных источниках современным состоянием вопроса, выявляя основные тенденции и объясняя полученные результаты.

Выводы диссертационного исследования Абаленихиной Ю.В. обоснованы и сформулированы четко, полностью соответствуют задачам и логически вытекают из результатов работы.

Подтверждение полученных результатов диссертации в научных изданиях

Материалы диссертации представлены в 48 научных работах, в число которых входят 16 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 13 – в изданиях, входящих в международную цитатноаналитическую базу данных Scopus, получено 3 патента на изобретение, внедрено 4 рационализаторских предложения. Работа была поддержана грантом Президента РФ (МК-1856.2020.7).

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание и основные положения диссертационной работы. Оформление автореферата соответствует современным требованиям.

Представленная диссертационная работа представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование, заслуживающее высокой оценки. Содержание, структура и оформление диссертационной работы Абаленихиной Ю.В. в полном объеме соответствует требованиям, предъявляемым к работам на соискание ученой степени доктора наук.

В тексте диссертации обнаружены некоторые опечатки и неудачные выражения, что в целом не влияет на положительную оценку работы. Возникли следующие вопросы:

1. В обзоре литературы весьма кратко представлены данные о пострансляционной модификации и протеолизе Pgp. Можно ли считать обозначенные процессы важными с точки зрения регуляции в условиях окислительного стресса? Целесообразна ли оценка синтеза и протеолиза Pgp для описания механизмов регуляции его активности в условиях окислительного стресса ?

2. В ходе работы проводилась оценка влияния БСО на Pgp и оценивалась вовлеченность транскрипционных факторов CAR и PXR в регуляцию белка-транспортера в условиях моделирования окислительного стресса. Проводился ли анализ прямого влияния БСО на указанные транскрипционные факторы?

3. Почему при оценке ингибирующей способности БСО сравнительный анализ проводился с 2 ингибиторами: хинидин и верапамил, а при оценке жизнеспособности клеток использован только верапамил?

4. Можно ли по результатам исследования сделать выводы о взаимосвязи процессов липопероксидации и окислительной модификации белков в условиях экзо – и эндогенного окислительного стресса?

Заключение

Диссертация Абаленихиной Юлии Владимировны «Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях эндогенного и экзогенного окислительного стресса *in vitro*» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия является законченной научно-квалификационной работой, формирующей новое направление в медико-биологической науке – исследование регуляции Р-гликопротеина в условиях окислительного стресса *in vitro* за счет активации транскрипционных факторов и сигнальных внутриклеточных путей.

Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением

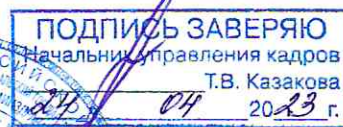
Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в действующей редакции), а ее автор, Абаленихина Юлия Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой Биохимии имени Р.И. Лифшица,
ведущий научный сотрудник центральной
научно-исследовательской лаборатории
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук (03.01.04. Биохимия),
доцент

Синицкий Антон Иванович

24.09.2023



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Адрес: 454092, Российская Федерация, Уральский Федеральный округ, Челябинская область, г. Челябинск, ул. Воровского д. 64
Телефон: +7(351)232-74-76
E-mail: kanc@chelma.ru, sinitskiyai@yandex.ru