

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

Калинин Р.Е.

«30»

июня

2023 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Диссертация «Влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора» выполнена на кафедре фармакологии.

В период подготовки диссертации соискатель Сеидкулиева Адамиана Аманмамедовна работала на кафедре фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в должности ассистента.

В 2021 году окончила федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Фармация».

Справка об обучении № 1785 выдана в 2023 году федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени

академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: Шулькин Алексей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, профессор кафедры.

По итогам обсуждения диссертации принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

Прегнан Х рецептор (PXR, англ.: pregnane X receptor) и конститутивный андростановый рецептор (CAR, англ.: constitutive androstane receptor) являются членами суперсемейства ядерных рецепторов – лиганд-активируемых факторов транскрипции клеток. Взаимодействуя с соответствующими лигандами, коактиваторами и корепрессорами они контролируют защиту организма от ксенобиотиков, дифференцировку клеток, поддержание гомеостаза и метаболические процессы.

В частности, было показано, что PXR и CAR регулируют экспрессию ферментов I (изоферменты цитохрома P450 CYP3A и CYP2B) и II фазы биотрансформации (UDP-глюкуронозилтрансферазы 1A1, сульфотрансферазы), переносчиков лекарственных средств (MDR1, MRP2), а CAR, кроме того, подавляет экспрессию ферментов углеводного и липидного обменов.

PXR и CAR локализуются преимущественно в печени и кишечнике. Классическим индуктором PXR является рифампицин, CAR – фенobarбитал.

Окислительный стресс – патологический процесс, возникающий вследствие гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) с одной стороны и недостаточной емкости антиоксидантной системы защиты с другой. Развитие окислительного стресса вызывает повреждение биомакромолекул (белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот) и, как следствие, нарушение нормального функционирования клеток, вплоть до их гибели путем некроза или

апоптоза.

Кроме того, было показано, что АФК могут выполнять и регуляторную роль запуская внутриклеточные сигнальные каскады, например, Nrf2/Keap1/ARE. Ядерный фактор эритроидного происхождения-2 (Nrf2, англ.: nuclear factor erythroid 2-related factor 2) в физиологических условиях находится в неактивной форме в цитозоле за счет связывания с белком Keap1, что способствует его быстрой деградации.

При развитии окислительного стресса АФК способствуют диссоциации Nrf2 и Keap1 путем окисления ключевых остатков цистеина (Cys273, Cys288, и Cys151), регулирующих активность Keap1, или путем активации таких киназ, как протеинкиназа С (ПКК), митоген-активируемые протеинкиназы (MAPKs), фосфатидилинозитид-3-киназы (PI3Ks, англ.: phosphoinositide 3-kinases), которые фосфорилируют Nrf2. Далее диссоциированный Nrf2 транслоцируется в ядро и связывается с элементами антиоксидантного ответа (ARE, англ.: antioxidant response elements), запуская транскрипцию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, а также ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, в том числе NAD(P)H-хиноноксидоредуктазу, глутатионтрансферазу, УДФ-глюкуронилтрансферазу, CYP2A5.

NO (оксид азота) – эндогенная сигнальная молекула, которая реализует свои основные физиологические функции через активацию растворимой гуанилатциклазы (pГЦ), поэтому для оценки регуляторной роли NO необходимо учитывать данный вторичный посредник.

С другой стороны, при взаимодействии АФК с NO, образуются активные формы азота (АФА), например, пероксинитрит, который самостоятельно также участвует в многочисленных сигнальных каскадах, а также вызывает повреждение биомолекул.

Поскольку в результате развития окислительного и нитрозативного стресса накапливаются продукты окисления эндогенных молекул, которые являются токсичными для клеток, можно предположить, что в защите клеток от их воздействия могут принимать участие PXR и CAR. Многогранная регуляторная роль NO, АФК и АФА, также дает возможность предположить,

что в их сигнальных каскадах также могут участвовать данные орфанные рецепторы.

Изучение влияния пероксида водорода и оксида азота на PXR и CAR, а также выявление механизмов данного влияния является актуальной проблемой биохимии, решение которой позволит расширить представление о молекулярных механизмах регуляции данных орфанных рецепторов, разработать подходы к направленной модуляции их активности и оценить их роль в защите клеток от окислительного и нитрозативного стресса.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Автором было исследовано влияние пероксида водорода и донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в зависимости от концентрации и времени воздействия. Был установлен диапазон токсических концентраций тестируемых веществ. Определено относительное количество и активность прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора во всех сериях экспериментов. Оценена роль изучаемых рецепторов в защите клеток от воздействия окислительного и нитрозативного стресса.

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

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне с использованием статистических методов: для оценки статистической значимости различий между двумя группами использовали t-критерий Стьюдента, при сравнении более чем двух групп применяли дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). В работе использованы современные фотометрические и иммунологические методы, адекватные цели и задачам исследования.

Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований со статистической обработкой результатов с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.

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 на клетках линии Caco-2 *in vitro* впервые:

1. Установлено, что пероксид водорода (10-100 мкМ) при длительности воздействия 24 ч повышает уровень прегнан Х рецептора, а при 72 ч экспозиции (5-50 мкМ) увеличивает содержание конститутивного андростанового рецептора. Индукция прегнан Х рецептора и конститутивного андростанового рецептора не приводила к их активации (транслокации в ядро). Усиление окислительного стресса (увеличение длительности воздействия для прегнан Х рецептора и повышение концентрации пероксида водорода до 100 мкМ для конститутивного андростанового рецептора) приводит к снижению уровня рецепторов.

2. Показано, что повышение относительного количества прегнан Х рецептора под действием пероксида водорода опосредовано воздействием малонового диальдегида, а индукция конститутивного андростанового рецептора – транскрипционным фактором Nrf2.

3. Показано разнонаправленное действие S-нитрозоглутатиона на уровень прегнан Х рецептора и конститутивного андростанового рецептора в зависимости от концентрации донора оксида азота II и длительности воздействия. Индукция прегнан Х рецептора и конститутивного андростанового рецептора не приводила к их активации (транслокации в ядро).

4. Выявлено, что индукция прегнан Х рецептора и конститутивного андростанового рецептора при воздействии GSNO опосредуется воздействием

продукта нитрозативного стресса – битирозина. Уменьшение количества прегнан X рецептора и повышение уровня конститутивного андростанового рецептора при низких концентрациях донора NO опосредуется NO-цГМФ-сигнальным путем.

5. Доказано, что прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор не играют защитной роли при развитии окислительного и нитрозативного стресса, а наоборот повышают чувствительность клеток к их развитию.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Ингибирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора может стать решением проблемы развития устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам, поскольку при этом происходит снижение экспрессии целевых генов, участвующих в метаболизме лекарственных веществ и их эффлюксном транспорте, что, возможно, повысит эффективность проводимой терапии.

Ценность научных работ соискателя

Заключается в изучении механизмов влияния пероксида водорода и донора оксида S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора. Выявленные новые механизмы регуляции прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора, могут являться мишенями для направленной регуляции данных рецепторов, что важно для повышения эффективности терапии ряда заболеваний, в частности, онкологической патологии.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена изучению влияния пероксида водорода и донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора. Она соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, полно

отражающих основные положения диссертации, в том числе 5 статей в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из них 5 – в журналах, входящих в цитатно-аналитические базы данных Scopus и Web of Science, получен 1 патент РФ на изобретение.

1. Функционирование прегнан X рецептора в условиях окислительного стресса / Ю.В. Абаленихина [и др.] // Биологические мембраны. - 2022. – Т.39, №1. – С.1-9. - DOI: 10.31857/S0233475522010030 (соавт. Судакова Е.А., Слепнев А.А., Сеидкулиева А.А., Ерохина П.Д., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.)

2. Индукция конститутивного андростанового рецептора при развитии окислительного стресса / А.В. Щулькин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т.171, №5. – С.588-591. - DOI: 10.47056/0365-9615-2021-171-5-588-591 (соавт. Абаленихина Ю.В., Сеидкулиева А.А., Рябков А.Н., Якушева Е.Н.)

3. Функционирование прегнан X рецептора в условиях нитрозативного стресса / Ю.В. Абаленихина [и др.] // Биомедицинская химия. – 2021. – Т.67, вып.5. – С.394-401. - DOI: 10.18097/PBMC20216705394 (соавт. Судакова Е.А., Сеидкулиева А.А., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.)

4. Влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора / Ю.В. Абаленихина [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58. – № 5. – С.410-420. – DOI: 10.31857/S0044452922050023 (соавт. Е.А. Судакова, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева)

5. Регуляция конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Сасо-2 при моделировании окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина [и др.] // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68. - №4. – С. 297–301. – DOI: 10.18097/PBMC20226804297 (соавт. Щулькин А.В., Сеидкулиева А.А., Правкин С.К., Якушева Е.Н.)

6. Пат. RU 2755507 С1 РФ, МПК С12N 1/00. Способ повышения количества конститутивного андростанового рецептора / А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 2021105606; зарегистр. 04.03.2021, опубл. 2021.

Диссертация «Влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора» Сеидкулиевой Адамианы Аманмамедовны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на межкафедральном заседании кафедр: фармацевтической химии; управления экономики и фармации; биологической химии; фармакологии; центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Присутствовало на заседании профессорско-преподавательского состава 11 человек. Результаты голосования: «за» – 11 человек; «против» – нет; «воздержались» – нет (протокол № 1 от 22 июня 2023 года).

Председатель межкафедрального совещания,
заведующий кафедрой биологической химии
с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
к.м.н., доцент

Матвеева Ирина Васильевна

Подпись к.м.н., доцента Матвеевой И.В. заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
д.м.н., профессор



Сучков Игорь Александрович