

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента Мирошниченко Игоря Ивановича на диссертационную работу Черных Ивана Владимировича «ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р В ТЕРАПИИ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук в диссертационный совет 24.1.183.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова») по специальности 3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

### **Актуальность темы**

Нарушения мозгового кровообращения приводят к возникновению сложных неврологических заболеваний, среди которых выделяется инсульт. Высокий уровень заболеваемости, инвалидности, смертности, частоты рецидивов и большое число осложнений означает серьезную опасность для здоровья и безопасности человека, что обуславливает актуальность терапии церебральной ишемии. Абсорбция вещества напрямую зависит от прохождения его через кишечную стенку. Кроме процессов диффузии необходимо учитывать вклад транспортных белков. Среди переносчиков особое внимание привлекает гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) представляет собой энергозависимый мембранный белок-транспортер. Локализуясь в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), транспортер препятствует проникновению в мозг ксенобиотиков, среди которых, однако большое число лекарственных веществ, в том числе нейропротекторов. Активность данного белка может повышаться или снижаться под влиянием различных факторов и веществ эндогенной и экзогенной природы.

В ходе изучения действия гипоксии различных видов на активность гликопротеина-Р были получены противоречивые результаты, а механизмы этого влияния недостаточно изучены. Кроме того, целесообразность фармакологического ингибирования транспортера локально в ГЭБ для повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических патологий мозга не выяснена. Также ряд широко применяемых лекарственных средств с

нейропротекторной активностью не изучен на принадлежность к числу субстратов и модуляторов активности гликопroteина-Р. Это и послужило обоснованием актуальности данного диссертационного исследования.

### **Научная и практическая значимость исследования**

Научная и практическая значимость представленного исследования подтверждается тем, что автором показано повышение абсолютного количества гликопroteина-Р в мозге на фоне глобальной и ряде моделей фокальной церебральной ишемии, что подразумевает коррекцию доз субстратов Рgp в сторону увеличения при фармакотерапии заболеваний мозга, сопровождающихся гипоксией. При этом установлено участие транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 в регуляции функционирования гликопroteина-Р.

Хроматографические методики количественного анализа мексидола (этилметилгидроксиридина сукцинат), омберацетама (ноопепт) и фабомотизола (афобазол), которые валидированы автором, можно использовать для изучения их фармакокинетики.

Независимость фармакокинетики этилметилгидроксиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола от функционирования гликопroteина-Р свидетельствует о возможности их безопасного применения в комбинации с модуляторами его активности. С другой стороны, ингибирование транспортера Рgp сукцинатом этилметилгидроксиридина и фабомотизолом подтверждает необходимость корректировки доз лекарственных веществ-субстратов гликопroteина-Р при назначении совместно с протестированными нейропротекторами.

Усиление фармакологического эффекта субстрата гликопroteина-Р с нейропротекторной активностью при его комбинированном введении совместно с ингибитором транспортера демонстрирует перспективность снижения активности гликопroteина-Р в ГЭБ на фоне глобальной ишемии мозга. Отсутствие подобной динамики при окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии свидетельствует о

нецелесообразности ингибиования гликопротеина-Р в ГЭБ для повышения эффективности терапии последствий фокальной ишемии мозга, что связано с нарушением структуры и повышением проницаемости барьера.

### **Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций**

Диссертационное исследование имеет высокую степень научной новизны, и все результаты получены впервые.

В рамках диссертационного исследования впервые показано повышение количества гликопротеина-Р в головном мозге на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий и при ряде моделей окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии крыс. При этом выявлено, что функциональная активность транспортера в ГЭБ на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии снижается, что сопровождается также нарушением структуры барьера. Автором впервые показано, что ни один из изученных лекарственных средств с нейропротекторной активностью (мексидол, ноопент и афобазол) не является субстратом гликопротеина-Р, при этом мексидол и афобазол снижают активность транспортера. Также продемонстрировано, что угнетение транспортера в ГЭБ не является эффективной мерой для повышения эффективности нейропротекторной терапии фокальной ишемии мозга (ишемического инсульта), однако должно быть принято к сведению.

### **Общая оценка использованных методов, содержания и оформления диссертации**

Работа написана по традиционному плану: состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, выводов, списка литературы, включающего достаточное количество источников как отечественных, так и зарубежных авторов, иллюстрирована таблицами и рисунками.

Во введении дано обоснование актуальности темы исследования, указаны степень разработанности проблемы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описана методология и методы исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор отечественной и зарубежной литературы. Изложены современные сведения о структуре и принципах функционирования гликопротеина-Р, описаны основные механизмы его регуляции, подробно представлены современные данные о влиянии гипоксических состояний на активность транспортера и подтверждена состоятельность идеи о его вероятной роли в неэффективности нейропротекторной терапии ишемии мозга.

Во второй главе описаны материалы и методы, применяемые в исследовании.

Для оценки функционирования гликопротеина-Р автор использовал фармакокинетические, имmunогистохимические и иммуноферментные методы. Применялись два вида животных: крысы Вистар и кролики породы Шиншилла с подробным обоснованием выбора объектов исследования. Экспериментальные патологии моделировались автором в условиях операционной вивария с соблюдением правил гуманного обращения с животными.

В третьей главе приведены полученные результаты, а в четвертой – их обсуждение и сопоставление с имеющимися литературными данными.

В ходе исследования было показано, что билатеральная окклюзия общих сонных артерий крыс приводит к возрастанию абсолютного количества гликопротеина-Р в коре головного мозга, что сопровождается возрастанием уровня транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1. Функциональная активность транспортера в ГЭБ коры головного мозга крыс повышается на фоне 14-дневного внутрижелудочного введения крысам индуктора гликопротеина-Р – рифамицина и снижается на фоне однократного внутривенного введения его ингибитора – омепразола, что подтверждает работоспособность методики оценки активности транспортера в барьере. Продемонстрировано, что односторонняя окклюзия

общей сонной артерии кроликов не приводит к изменению активности белка-транспортера на уровне целостного организма. Доказано, что 30- и 60-минутная окклюзия средней мозговой артерии крыс с последующей 24-часовой реперфузией приводит к возрастанию абсолютного количества гликопротеина-Р в коре головного мозга, что сопровождается увеличением количества транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры головного мозга и развитием выраженного окислительного стресса. При этом функциональная активность транспортера в ГЭБ снижается, что связано с нарушением структуры барьера. Автором модифицированы и валидированы ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов этилметилгидроксиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов, и показано, что этилметилгидроксиридина сукцинат и фабомотизол ингибируют функциональную активность гликопротеина-Р на уровне целостного организма, а омберацетам не изменяет ее. Также показано, что в контроле фармакокинетики протестированных веществ транспортеру не принадлежит существенная роль.

В дальнейшем выявлено, что введение крысам комбинации нейропротектора-субстрата гликопротеина-Р – нимодипина совместно с ингибитором транспортера – омепразолом повышает выживаемость и снижают уровень неврологического дефицита животных на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий по сравнению с изолированным введением нимодипина. С другой стороны, введение крысам аналогичной комбинации не уменьшает величину зоны некроза головного мозга, вызванной окклюзией-реперфузией средней мозговой артерии, по сравнению с изолированным введением нимодипина. Таким образом, автор заключает, что фармакологическое ингибирование гликопротеина-Р в ГЭБ является актуальным при лечении обширного инсульта.

В четвертой главе «Обсуждение полученных результатов» проведен анализ и сопоставление полученных результатов с современными литературными данными.

Сформулированные выводы полностью отражают результаты исследования, отличаются четкостью формулировок и обоснованностью.

Практические рекомендации, сделанные по итогам диссертационной работы, подчеркивают целесообразность фармакологического ингибиования гликопротеина-Р в ГЭБ только при глобальном нарушении мозгового кровообращения, но не при фокальном, в связи с нарушением структуры барьера.

Также хотелось бы отметить, что полученные результаты открывают новое направление дальнейших исследований, в частности клиническую оценку эффективности комбинации нейропротектора-субстрата гликопротеина-Р и ингибитора активности транспортера для более эффективной терапии церебральных патологий с хронической глобальной ишемией.

Автореферат диссертации написан четким, лаконичным языком, достаточно информативен и иллюстрирован; полностью отвечает содержанию диссертационной работы.

По материалам исследования опубликована 51 научная работа, в том числе 20 в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки России. Публикации полно отражают основное содержание диссертации. Фрагменты диссертационного исследования были представлены на международных и всероссийских научно-практических конференциях. Материалы исследования внедрены в учебный процесс ряда кафедр Рязанского государственного медицинского университета.

#### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Диссертационная работа подготовлена на базе кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, имеющей многолетний опыт изучения белка-транспортера гликопротеина-Р, поэтому она выполнена на высоком методическом уровне, описана грамотным научным литературным языком и имеет глубокую фундаментальную и практическую научную значимость. В целом работа производит положительное впечатление. К

ее достоинствам также следует отнести наглядность представления данных в таблицах и рисунках, что позволяет составить полноценное мнение о масштабности проделанного исследования.

Целью диссертационной работы явилась оценка функционирования и механизмов регуляции гликопротеина-Р на фоне глобальной и фокальной церебральной ишемии для анализа возможностей и перспектив его направленной фармакологической регуляции для повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических патологий.

При выполнении работы были поставлены задачи по оценке функционирования гликопротеина-Р на фоне глобальной и фокальной ишемии мозга и изучению его регуляторных механизмов; исследованию влияния глобальной церебральной ишемии на активность транспортера на уровне целостного организма; анализу принадлежности нейропротекторных лекарственных средств к субстратам и модуляторам активности гликопротеина-Р с предварительной модификацией и валидацией соответствующих ВЭЖХ-методик их количественного определения в плазме крови; оценке целесообразности снижения функциональной активности транспортера в ГЭБ как метода повышения эффективности нейропротекторного лечения последствий глобальной и фокальной ишемии головного мозга.

Успешное решение в ходе выполнения работы всех поставленных перед диссидентом задач позволили реализовать цель исследования и прийти к обоснованным выводам.

Обоснованность диссертационной работы Черных Ивана Владимировича подтверждается комплексностью подходов и решения сформулированных задач, логичностью выбора тест-систем и доз вводимых лекарственных средств.

Достоверность положений, выносимых на защиту и выводов, приведенных Черных И.В., обусловлена достаточным фактическим материалом (86 кроликов породы Шиншилла, 507 крыс линии Вистар, что небезупречно с биоэтической

точки зрения, но допустимо), высоким методическим уровнем проведенного исследования, информативностью использованных в работе методов, обоснованностью критериев статистического анализа данных. Выводы исследования логично вытекают из достигнутых результатов и их научной трактовки.

Используемые автором ВЭЖХ-методики количественного определения маркерного субстрата гликопротеина-Р – фексофенадина, а также нейропротекторных лекарственных средств валидированы в соответствии с международными рекомендациями и являются точными, воспроизводимыми и чувствительными.

### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний к работе нет. Однако при ознакомлении с диссертацией возникло несколько вопросов:

1. Чем обусловлен выбор препаратов для исследования: нейропротектор, ноотроп и транквилизатор.
2. ВЭЖХ – мало пригодна для анализа фексофенадина. Длина волны поглощения 206 нм для омберацетама требует применения растворителей очень высокого качества.
3. Для определения мексидола предпочтительно использовать флуоресцентный детектор.
4. Обсчет: малые выборки, нет показателя всасываемости Эдренуи ( $f'$ ) =  $C_{max}/AUC(0-t)$  ЛВ.
5. Написано хорошим русским языком, тем не менее, встречаются опечатки, впрочем, немногочисленные.

### **Заключение**

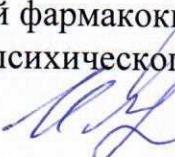
По актуальности, научной новизне, большой научно-практической значимости, диссертация Черных Ивана Владимировича «Фармакологическая регуляция гликопротеина-Р в терапии нарушений мозгового кровообращения»

является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения по нецелесообразности ингибирования гликопротеина-Р в ГЭБ для повышения эффективности фармакотерапии фокального нарушения мозгового кровообращения, но актуальности подобного подхода при глобальной церебральной ишемии, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение, имеющее значение для развития фармакологии, клинической фармакологии и медицины в целом.

Диссертация соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (в ред. постановления Правительства РФ от 21.04.2016 №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а автор Черных И.В. достоин присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент  
доктор медицинских наук

Заведующий лабораторией фармакокинетики  
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»

  
Мирошниченко Игорь Иванович

«27» сентябрь 2021 г.

115522, Москва, Каширское шоссе, д. 34, Телефон: 8 (495) 109-0393  
Email: igormir@psychiatry.ru

Подпись И.И. Мирошниченко заверяю  
Ученый секретарь ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»,

Профессор, д.м.н.

  
Бархатова Александра Николаевна