

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора медицинских наук
Яснецова Виктора Владимировича на диссертационную работу
Черных Ивана Владимировича на тему «Фармакологическая регуляция
гликопротеина-Р в терапии нарушений мозгового кровообращения»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология**

Актуальность темы диссертационного исследования

Как известно, гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) – это АТФ-зависимый мембранный эффлюксный транспортер, удаляющий из клетки во внеклеточное пространство широкий спектр веществ различной химической структуры, включая лекарственные средства. Он широко представлен в организме: экспрессируется в кишечнике, почках, печени и гистогематических барьерах. Этот белок-транспортер препятствует абсорбции, участвует в экскреции (с мочой и желчью) и тканевом распределении веществ, являющихся его субстратами. В гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) его функция заключается в ограничении проникновения в головной мозг веществ из крови.

Повышение синтеза и функциональной активности Pgp в опухолевых клетках связано с феноменом их множественной лекарственной устойчивости, а индукция транспортера в ГЭБ влечет неэффективность фармакотерапии ряда заболеваний головного мозга, в том числе при ишемическом поражении. Таким образом, снижение активности Pgp представляет собой перспективную стратегию для решения подобных проблем.

Функционирование Pgp может значительно изменяться под действием различных факторов внешней и внутренней среды, подвергаясь при этом широкому ряду эндогенных регуляторных влияний. Исследования *in vivo* по оценке активности транспортера на фоне гипоксии различного генеза показали противоречивые результаты. Кроме того, в литературе отсутствует информация

о целенаправленном снижении активности Pgr в ГЭБ как методе повышения эффективности нейропротекторной фармакотерапии церебральной ишемии.

Поэтому актуальность диссертационного исследования Черных И.В., посвященного изучению функционирования Pgr на фоне глобальной и фокальной ишемии головного мозга, анализу механизмов, регулирующих его работу, а также оценке возможности фармакологической регуляции этого транспортера для повышения эффективности нейропротекторной терапии при нарушении мозгового кровообращения, не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором впервые показано, что абсолютное количество Pgr в коре большого мозга крыс повышается на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий, что коррелирует с интенсификацией липопероксидации, увеличением количества транскрипционного фактора Nrf2 в ткани коры и сопровождается повышением уровня транскрипционного фактора NF- κ B. Продemonстрировано увеличение абсолютного количества Pgr в головном мозге при 30- и 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии с последующей 24-часовой реперфузией, что также сопровождается активацией перекисного окисления липидов и ростом количества Nrf2 в коре.

В ходе исследования модифицированы и валидированы три ВЭЖХ-методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови кроликов. Установлено, что ни одно из указанных лекарственных средств не является субстратом Pgr. Однако этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол при курсовом введении кроликам ингибируют функциональную активность

транспортера, а фабомотизол также снижает его относительное количество в печени.

Кроме того, в экспериментах на кроликах выявлено отсутствие изменений системной функциональной активности Pgp на фоне глобальной ишемии мозга.

Проведена оценка активности Pgp локально в ГЭБ крыс, и показано ее повышение на фоне курсового введения животным классического индуктора Pgp – рифампицина и снижение на фоне ингибитора – омепразола.

Также доказано снижение летальности и степени выраженности неврологического дефицита у крыс при курсовом введении комбинации нимодипина, обладающего нейропротекторными средствами и являющегося субстратом Pgp, и ингибитора транспортера омепразола на фоне глобальной ишемии головного мозга по сравнению с использованием одного нимодипина. При этом данная комбинация на фоне фокальной церебральной ишемии с реперфузией не сокращает зону некроза мозга по сравнению с применением нимодипина, что связано со снижением функциональной активности транспортера в ГЭБ и нарушением его проницаемости.

Научно-практическая значимость

Результаты исследования обосновывают возможность корректировки доз лекарственных средств, являющихся субстратами Pgp, в сторону увеличения при фармакотерапии ишемических поражений головного мозга.

Интерес для научно-исследовательской деятельности представляют также хроматографические методики определения концентраций фексофенадина и нейропротекторных лекарственных средств в плазме крови кроликов, для которых была доказана точность, прецизионность, селективность и стабильность.

Полученные в исследовании данные существенно расширяют представления о регуляции функционирования Pgr и ее механизмах на фоне ишемии мозга. Это дает возможность прогнозирования межлекарственного взаимодействия на уровне транспортера при фармакотерапии его субстратами в сочетании с этилметилгидроксипиридина сукцинатом и фабомотизолом. Кроме того, полученные результаты обуславливают целесообразность ингибирования функциональной активности транспортера на фоне глобальной церебральной ишемии для повышения эффективности ее нейропротекторной терапии и неактуальность такого подхода при фокальной ишемии, что связано с нарушением структуры ГЭБ.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций

Достаточный объем хорошо спланированных исследований, использование валидированных экспериментальных моделей и тестов, а также детальный анализ полученных результатов позволяют утверждать, что выводы и положения диссертации экспериментально обоснованы.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью адекватных методов математической статистики, общепринятых в медико-биологических исследованиях, в связи с чем достоверность полученных результатов и сделанных на этом основании выводов не вызывает сомнений.

Структура и содержание работы

Диссертация изложена на 262 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав (обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 375

источников (из них 258 – зарубежных). Работа иллюстрирована 50 таблицами и 59 рисунками.

Во введении диссертации автором четко сформулированы актуальность, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы отражены современные сведения о структуре, локализации и механизмах регуляции Pgr. Отдельные разделы освещают современные данные о функционировании транспортера на фоне различных видов гипоксии, а также подходы к тестированию лекарственных веществ на принадлежность к ингибиторам/индукторам белка-транспортера.

Во второй главе описаны материалы и методы исследования. Подробно изложены методики воспроизведения церебральных ишемии и ишемии-реперфузии у животных, иммуногистохимические, иммуноферментные, биохимические и фармакокинетические методы исследования (высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием и др.), характеризующиеся адекватной полнотой и высокой информативностью.

Результаты исследований представлены в главе 3. Показано, что у крыс абсолютное количество Pgr возрастает на фоне билатеральной окклюзии общих сонных артерий, что сопровождается ростом уровня транскрипционных факторов HIF-1 и Nrf2. На фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии крыс абсолютное количество транспортера возрастает только при 30- и 60-минутной окклюзии с суточной реперфузией. Выявлено также, что ишемия мозга не влияет на активность Pgr на уровне целостного организма. В дальнейшем установлено, что ни одно из протестированных лекарственных средств с нейропротекторной активностью не является субстратом Pgr, при этом этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол снижают

активность транспортера на уровне целостного организма. Также установлено, что при комбинированном введении крысам субстрата Pgr нимодипина и ингибитора транспортера омепразола церебропротекторный эффект первого усиливается. Однако на фоне окклюзии-реперфузии средней мозговой артерии такого действия комбинации не наблюдается, что связано с нарушением структуры ГЭБ.

В главе «Обсуждение результатов» подведены общие итоги исследования, в краткой форме обобщены основные положения диссертации, достаточно полно и глубоко проведен анализ полученных результатов и их сопоставление с данными литературы.

Выводы и практические рекомендации непосредственно вытекают из полученных данных, обоснованы, строго аргументированы, соответствуют целям и задачам исследования и положениям, выносимым на защиту.

Автореферат отражает основные положения диссертации и оформлен в соответствии с современными требованиями.

Результаты исследований полностью опубликованы в 51 печатной работе, в том числе в 20 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ, 8 из которых – в журналах, входящих в международные базы цитирования Scopus и Web of Science.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний и возражений по диссертации нет.

Однако в ней, как и в любой большой работе, встречаются некоторые опечатки, неточности и неудачные стилистические обороты.

Также при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Чем обусловлен выбор доз нейропротекторных лекарственных средств при анализе их влияния на функциональную активность гликопротеина-Р?

2. Учитывая Ваши данные об ингибирующем влиянии этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола на функциональную активность гликопротеина-Р на уровне целостного организма, комбинация какого из этих лекарственных средств с нимодипином при глобальной ишемии головного мозга представляется наиболее рациональной?

3. Могут ли, по Вашему мнению, в основе ингибирующего действия этилметилгидроксипиридина сукцината на функциональную активность гликопротеина-Р лежать еще какие-либо механизмы, кроме его прямой антиоксидатной активности?

Следует отметить, что сделанные замечания, безусловно, не снижают общую положительную оценку диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Черных Ивана Владимировича «Фармакологическая регуляция гликопротеина-Р в терапии нарушений мозгового кровообращения» является законченным научно-квалификационным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения по целесообразности ингибирования функциональной активности транспортера гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере с целью повышения эффективности фармакотерапии различных нарушений мозгового кровообращения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее важное значение для фармакологии и клинической фармакологии.

По актуальности темы, объему выполненных автором исследований,

новизне полученных данных и их научно-практической значимости, опубликованным результатам диссертационная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент
доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории экспериментальной
и клинической фармакологии
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр РФ –
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук
(ГНЦ РФ – ИМБП РАН)



Яснецов Виктор Владимирович

«23» сентября 2021 г.

ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва, 123007, Хорошевское шоссе, 76 А; тел.: (903) 700-87-18, e-mail: vicyas@yandex.ru

Подпись д.м.н. В.В. Яснецова заверяю

Ученый секретарь
ГНЦ РФ – ИМБП РАН,
доктор биологических наук



Левинских Маргарита Александровна