



РОССИЙСКАЯ
ВОЕННО-
МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ

КАФЕДРА
ФАРМАКОЛОГИИ



Санкт-Петербург, 194175, ул. Лебедева, д. 6
E-mail: nevka@mail.rcom.ru

Тел.: (812) 542-43-97
Факс: (812) 234-94-87

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук профессора
Зарубиной Ирины Викторовны
на диссертационную работу ЧЕРНЫХ ИВАНА ВЛАДИМИРОВИЧА на тему:
«Фармакологическая регуляция гликопротеина-Р в терапии нарушений мозгового
кровообращения», представленную к защите на соискание ученой степени
доктора биологических наук
по специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы исследования

В структуре Национального проекта «Здравоохранение» на период до 2024 г. в число основных задач развития системы охраны здоровья включено повышение качества лечения больных с сердечно-сосудистыми патологиями. Среди цереброваскулярных заболеваний острые нарушения мозгового кровообращения являются ведущей причиной смертности и инвалидизации. Неуклонно возрастает и количество пациентов с явлениями хронической ишемии головного мозга, что влечет сложные медико-социальные последствия, связанные с сосудистой деменцией, когнитивными дисфункциями и пр.

Это определяет актуальность поиска путей повышения эффективности терапии цереброваскулярных заболеваний, в патогенезе которых одним из основных факторов является гипоксия. В настоящее время среди препаратов многих фармакологических групп, применяемых для лечения гипоксических и ишемических патологий различного генеза, встречаются субстраты для мембранного белка-транспортера гликопротеина-Р, отвечающего за фармакокинетику этих препаратов, препятствуя их проникновению в органы и способствуя их экскреции печенью и почками. Регуляция действия этого транспортера может существенно влиять на результаты терапии, повышая интенсивность доставки нейропротекторов в ишемизированный головной мозг при ингибировании гликопротеина-Р или же снижая поступление токсичных веществ-субстратов при индукции белка-транспортера.

Однако до настоящего времени особенности функционирования гликопротеина-Р в условиях гипоксии-ишемии до конца не ясны, а имеющиеся в литературе сведения часто противоречивы.

В связи с этим исследование И.В. Черных, посвященное комплексному изучению функционирования гликопротеина-Р и его регуляции на фоне ишемического повреждения головного мозга, является актуальным по проблематике и перспективным для повышения эффективности терапии цереброваскулярных заболеваний.

Цель исследования автор видел в углубленном изучении функционирования гликопротеина-Р на фоне глобальной и фокальной церебральной ишемии для анализа возможности и перспективы направленной фармакологической регуляции транспортера и повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических патологий.

На основании цели сформулированы конкретные **задачи исследования** (9), которые заключались в изучении количества гликопротеина-Р и транскрипционных факторов Nrf2, HIF-1 в тканях головного мозга при ишемии (глобальной, фокальной) и реперфузии. В оценке зависимости количества белка-переносчика от интенсивности процессов ПОЛ, его функциональной активности в условиях ишемии на уровне целостного организма и в ГЭБ на фоне его индукторов и ингибиторов, а также целесообразности ингибирования переносчика для повышения фармакологического эффекта нейропротекторов-субстратов гликопротеина-Р. В изучении принадлежности нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола к числу субстратов и модуляторов функционирования белка-переносчика. Одной из задач была модификация ВЭЖХ-методики количественного определения изучаемых нейропротекторов в плазме крови.

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

В результате проведенных исследований диссертант сформулировал **ряд важных в теоретическом и практическом отношении положений** (8), подтвержденных восемью выводами.

Первое положение и вывод 1 касаются корреляции возрастания количества гликопротеина-Р с содержанием транскрипционного фактора Nrf2 и уровнем окислительного стресса. В главе 3 разделе 3.1.1. на основании экспериментов по определению абсолютного количества гликопротеина-Р, проведенных иммуноферментными методами, автором убедительно доказано, что билатеральная

окклюзия общих сонных артерий вызывает интенсификацию синтеза транспортера, что прямо коррелирует с уровнем липопероксидации, HIF-1 и фактора Nrf2, которому принадлежит основная роль в регуляции функционирования гликопротеина-P на ранних этапах ишемии.

Положение 2 и вывод 2 основаны на результатах, приведенных в разделе 3.1.2., подтверждающих сходную корреляцию на модели фокальной ишемии мозга при 30- и 60-минутной окклюзии средней мозговой артерии животных с последующей реперфузией. Однако при использовании более продолжительной фокальной ишемии мозга автором показано снижение абсолютного количества гликопротеина-P.

Положение 3 и соответствующий ему 3-й вывод сформулированы на основе модификации и валидации автором ВЭЖХ-методики количественного определения нейропротекторов (этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола) в плазме крови животных, что описано в разделе 3.2.1.

Автором усовершенствованы способы экстракции исследуемых веществ в пользу жидкостной вместо твердофазной, изменен состав подвижной среды, использована простая и удобная подготовка проб и применен УФ-спектрофотометрический метод детектирования. В целом И.В. Черных доказал точность и воспроизводимость модифицированного им метода ВЭЖХ.

Четвертое положение и 4-й вывод обоснованы экспериментальными данными, приведенными в разделе 3.2.1.4. о принадлежности использованных нейропротекторов к субстратам и модуляторам активности гликопротеина-P с помощью анализа их фармакокинетики на фоне курсового введения индуктора (рифампицина) и ингибитора (верапамила) белка-транспортера. Доказательство отсутствия субстратных свойств к транспортеру у этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола делает эти препараты безопасными с точки зрения фармакокинетических межлекарственных взаимодействий с модуляторами активности гликопротеина-P и подтверждает незначимое участие транспортера в регуляции их проникновения через ГЭБ.

В пятом положении и 5-м выводе автор утверждает, что на уровне целостного организма односторонняя окклюзия общей сонной артерии животных не приводит к изменению функциональной активности гликопротеина-P. Это находит подтверждение в результатах исследования, приведенных в разделе 3.3. По мнению автора, показатель содержания маркерных субстратов белка-транспортера в головном мозге животных можно использовать в качестве характеристики его функциональной активности в ГЭБ при моделировании ишемических патологий.

Положение 6 и относящийся к нему вывод 6 касаются обоснования повышения функциональной активности гликопротеина-Р в ГЭБ коры головного мозга животных на фоне введения его индуктора – рифампицина и снижения на фоне ингибитора – омепразола, оцененная по степени проникновения маркерного субстрата гликопротеина-Р – фексофенадина. Основанием для этого служат экспериментальные данные, приведенные в разделе 3.4. Полученные И.В. Черных результаты позволяют использовать указанные препараты, дозы и схемы их введения для моделирования состояний повышенной или пониженной функциональной активности белка-переносчика в ГЭБ.

Положение 7 и относящийся к нему вывод 7 касаются эффективности комбинированного применения нейропротектора-субстрата гликопротеина-Р – нимодипина совместно с ингибитором транспортера – омепразолом. В разделе 3.5. автором доказано, что применение подобной комбинации препаратов повышает выживаемость и снижает уровень неврологического дефицита животных на фоне глобальной ишемии по сравнению с изолированным введением нимодипина.

Это свидетельствует о целесообразности фармакологического ингибирования функциональной активности гликопротеина-Р в ГЭБ для повышения эффективности нейропротекторной терапии последствий глобальной ишемии мозга за счет интенсификации доставки в ткани мозга нейропротекторных средств-субстратов транспортера.

Положение 8 и связанный с ним вывод 8 касаются результатов введения животным комбинации нимодипина совместно с омепразолом при окклюзии-реперфузии СМА. В разделе 3.5.2. приводятся данные, свидетельствующие, что направленное снижение активности гликопротеина-Р не уменьшает величину зоны некроза в головном мозге, вызванного фокальной ишемией-реперфузией, по сравнению с изолированным введением нимодипина, что связано с нарушением структуры и проницаемости ГЭБ и/или со снижением активности транспортера.

Диссертационная работа была выполнена в соответствии с российскими и международными методическими рекомендациями. Результаты исследования получены на сертифицированном и современном оборудовании.

Таким образом, степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений соискателя следует признать высокой, что обеспечивается как количественной стороной изученного материала, так и качеством его обработки, представлением материала в виде рисунков и таблиц, их обстоятельного описания, а также квалифицированного и достаточного по объему анализа. Все это позволяет

оценить результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту и выводы как вполне обоснованные.

Полнота публикаций по результатам диссертационного исследования

По материалам диссертации И.В. Черных опубликовал ~~опубликовал~~ 51 работу: 20 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 8 – в журналах из списка Web of Science и Scopus. Получено 2 патента РФ и оформлены 4 рационализаторских предложения ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Все публикации в полной мере отражают существо работы.

Результаты диссертационного исследования были представлены на международных и всероссийских научно-практических конференциях.

Научная новизна

Научная новизна полученных результатов И.В. Черных состоит в следующем:

1. в установлении зависимости количества гликопротеина-Р от времени окклюзии сонных артерий и продолжительности реперфузии на моделях глобальной и фокальной ишемии головного мозга животных,
2. в доказательстве отсутствия принадлежности к субстратам гликопротеина-Р у нейропротекторов этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола. При этом этилметилгидроксипиридина сукцинат и фабомотизол при курсовом введении животным ингибируют функциональную активность транспортера, а фабомотизол также снижает его относительное количество на билиарной поверхности гепатоцитов,
3. в выявлении снижения гибели животных и неврологического дефицита у них в условиях глобальной ишемии головного мозга при курсовом введении крысам комбинации нейропротектора-субстрата гликопротеина-Р – нимодипина и ингибитора транспортера – омепразола по сравнению с изолированным введением нимодипина. На фоне фокальной ишемии применение данной комбинации препаратов не сокращает зону некроза мозга, что обусловлено снижением активности транспортера в ГЭБ и нарушением структуры и проницаемости барьера,
4. новым фактом является возможность характеризовать изменение активности гликопротеина-Р локально в ГЭБ с помощью анализа количества маркерного субстрата транспортера фексофенадина в головном мозге на фоне его ишемии,

5. автором модифицированы три оригинальные ВЭЖХ-методики количественного определения препаратов с нейропротективной активностью: этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола в плазме крови животных.

Научно-практическое значение работы

Экспериментальные исследования И.В. Черных помимо теоретического интереса имеют и практическую направленность, поскольку создают предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов транспортера в сторону увеличения при фармакотерапии заболеваний мозга гипоксического генеза.

Отсутствие свойств субстратов-гликопротеина-Р у этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола свидетельствует о возможности их безопасного применения в комбинации с модуляторами его активности.

Наличие у этилметилгидроксипиридина сукцината и фабомотизола способности снижать функциональную активность гликопротеина-Р позволяет прогнозировать в клинических исследованиях фармакокинетические взаимодействия данных препаратов и веществ-субстратов переносчика.

Результаты работы свидетельствуют о перспективности ингибирования активности гликопротеина-Р в ГЭБ при глобальной ишемии мозга для повышения эффективности терапии ее последствий и нецелесообразности снижения функциональной активности транспортера в ГЭБ при фокальной ишемии головного мозга.

Модифицированные автором ВЭЖХ-методики количественного анализа этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола пригодны для исследования фармакокинетики указанных средств.

Практическое значение также имеют полученные автором два патента РФ.

Результаты исследования И.В. Черных используются в образовательном процессе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на кафедре фармакологии с курсом фармации ФДПО, кафедре нормальной физиологии с курсом психофизиологии, кафедре патофизиологии, а также в научно-исследовательской работе ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, выполняющей тестирование новых оригинальных отечественных лекарственных препаратов на принадлежность к индукторам/ингибиторам гликопротеина-Р.

Структура и оформление работы

Основное содержание работы изложено на 262 страницах текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с изложением результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и указателя литературы, включающего 117 отечественных и 258 зарубежных источников, при этом 25% источников за последние 5 лет. В тексте диссертации содержится 59 рисунков, 50 таблиц.

Введение содержит все регламентированные ГОСТ 7.0.11-2011 основные структурные элементы. В нем обосновывается актуальность, новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цель и задачи, методология и методы исследования, сведения о личном вкладе автора, реализации и апробации материалов диссертации, выносимые на защиту положения.

В **первой главе** на основании современных литературных данных рассматриваются молекулярная структура гликопротеина-Р, его локализация и функции, в том числе и транспортные для лекарственных средств.

Дается анализ механизмам модуляции функционирования белка-переносчика в условиях гипоксии и способам оценки. Обсуждается роль гликопротеина-Р в фармакотерапии нарушений мозгового кровообращения. Приводится фармакологическая характеристика нейропротекторных лекарственных средств (этилметилгидроксипиридина сукцината, омберацетама и фабомотизола) как потенциальных субстратов гликопротеина-Р и модуляторов его функционирования.

Отмечу, что И.В. Черных проявлено хорошее знание отечественной и зарубежной литературы, а также свидетельствует о принадлежности исследования научному направлению кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО Рязанского государственного медицинского университета и наличии у автора осознания своей общности со сформировавшейся под руководством профессора Якушевой Е.Н. научной школой.

В целом это позволило И.В. Черных составить детальное представление о современном состоянии исследований по данной проблеме за последние десятилетия и сформулировать основание для изучения функционирования гликопротеина-Р при различных видах церебральной ишемии для поиска направленной регуляции белка-переносчика с целью повышения эффективности нейропротекторной терапии ишемических состояний.

Во **второй главе** представлены дизайн и методы исследования, которые включают

- моделирование церебральной ишемии (глобальной и фокальной),
- способы анализа проницаемости ГЭБ,
- в арсенале фармакокинетических методов оценка принадлежности лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р, анализ влияния лекарственных средств и окклюзии общей сонной артерии на функциональную активность гликопротеина-Р на уровне целостного организма, расчет фармакокинетических параметров исследуемых веществ,
- иммуногистохимические, иммуноферментные и биохимические методы,
- оценка эффективности комбинированного применения нейропротектора-субстрата и ингибитора гликопротеина-Р при глобальной и фокальной ишемии мозга, включающая уровень неврологического дефицита у животных и их выживаемость, а также зоны инфаркта мозга при окклюзии и реперфузии средней мозговой артерии,
- анализ функциональной активности гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере,
- математико-статистические методы исследования.

Эксперименты выполнены половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла, массой 3500–4300 г и белых крысах-самцах линии Wistar массой 250–360 г. Методические приемы, использованные автором, современны и в полной мере отвечают задачам исследования.

В третьей главе представлены собственные результаты исследования, посвященные функционированию гликопротеина-Р на фоне нарушений мозгового кровообращения, оценке принадлежности нейропротекторных лекарственных средств к субстратам и модуляторам действия гликопротеина-Р, его функциональной активности на уровне целостного организма при глобальной ишемии мозга и в ГЭБ коры больших полушарий мозга.

В конце каждого раздела главы автор приводит ссылки на свои публикации, подтверждающие полноту освещения результатов работы в печати. В целом, последовательность изложения результатов исследований заслуживает положительной оценки.

В **четвертой главе** корректно обсуждены результаты исследования и обобщены полученные данные. Все объяснения полученных результатов И.В. Черных подкрепляет авторитетными ссылками на современные публикации, касающиеся близких областей исследования.

В итоге автором сформулировано **8 выводов и практические рекомендации**, которые обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертации. Автор определяет **перспективные пути дальнейшей разработки темы**, в которых важное значение отводит клиническим исследованиям для доказательства перспективности комбинирования препаратов с нейропротекторной активностью и ингибиторов гликопротеина-Р для терапии нарушений мозгового кровообращения.

Полученные данные корректно обработаны с применением современных методов статистики, которые позволяют адекватно оценивать полученные результаты.

Оформление работы не вызывает нареканий. Структура работы хорошо продумана и спланирована. Достоинствами представленной научной работы являются методичность и детальность изложения материала, наглядность демонстрации данных в таблицах и рисунках, логичность и последовательность формулировки выводов.

Анализ экспериментальных данных диссертации И.В. Черных показал, что все поставленные задачи решены. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология.

Автореферат

Сведения, вошедшие в автореферат диссертации, соответствуют структуре диссертационной работы. Автореферат оформлен в соответствии с ГОСТом, замечаний по автореферату нет.

Основные замечания и вопросы по диссертационной работе

В качестве замечаний, не являющихся принципиальными, надо отметить следующее.

Модификации метода ВЭЖХ автором несомненное достоинство работы, однако размещение описания метода (с. 105-126) в главе результатов исследования вместо главы 2-й, посвященной методам исследования, представляется неуместным, поскольку разрывает последовательное восприятие изученных эффектов гликопротеина-Р при ишемии головного мозга.

В главе с обсуждениями результатов работы встречается неоправданно большой по объему анализ данных литературы (с. 187-191), часть которого без ущерба для обсуждения результатов можно включить в первую главу, посвященную литературному обзору.

В третьем положении, выносимом на защиту и соответствующем ему выводе не раскрыты изменения, внесенные автором в ВЭЖХ-методы количественного определения исследуемых нейропротекторов, что затрудняет оценку значимости модификации методов.

При изучении принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината (а далее и омберацетама и фабомотизола) к субстратам гликопротеина-Р (раздел 3.2.1.4.1.), в таблицах 22 и 23 и на рисунках 30 - 31 автор приводит фармакокинетические параметры исследуемых препаратов до введения модуляторов гликопротеина-Р, обозначая эту группу как «интактную». Очевидно, группа животных, получавших исследуемые препараты, по сути не является интактной и должна носить соответствующее название.

Встречаются неудачные выражения, например, «животные мужского пола» вместо «самцы» (с. 182).

В плане научной дискуссии хочется получить ответы на **вопросы**:

1. В работе установлено, что при фокальной ишемии головного мозга и последующей реперфузии увеличение продолжительности окклюзии СМА сопровождается снижением уровня гликопротеина-Р. Чем, по мнению автора, это обусловлено, кроме вероятного повреждения клеточных мембран?
2. Какими механизмами можно объяснить снижение функциональной активности гликопротеина-Р на фоне действия этилметилгидроксипиридина и фабомотизола, в чем схожесть и различие этих механизмов?
3. Чем, кроме короткого периода полувыведения омберацетама, объясняется отсутствие его влияния на функционирование белка-транспортера на уровне целостного организма при курсовом 14-дневном введении?

Заключение

Диссертационная работа И.В. Черных «Фармакологическая регуляция гликопротеина-Р в терапии нарушений мозгового кровообращения» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, теоретические положения которой являются крупным научным достижением в области изучения фармакотерапии ишемических повреждений головного мозга.

В работе содержится решение актуальной научной проблемы роли белка-транспортера гликопротеина-Р в эффективности и безопасности нейропротекторной терапии последствий ишемии головного мозга.

По актуальности темы, новизне полученных результатов, объему, методическому и методологическому уровню проведенных исследований, теоретической и научно-практической значимости, полноте опубликования результатов работы диссертация полностью соответствует требованиям пп.9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Иван Владимирович Черных, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент

старший преподаватель кафедры фармакологии

Федерального государственного бюджетного

военного образовательного учреждения высшего образования

«Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»

Министерства обороны Российской Федерации

доктор биологических наук профессор

«11» октября 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное

военное образовательное учреждение высшего образования

«Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»

Министерства обороны Российской Федерации

Адрес: 194044 г. Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д.6,
тел: (812) 542-43-97, vmeda.org; i.v.zarubina@inbox.ru

И.В. Зарубина

И.В. Зарубина

