

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук Марышевой Веры Васильевны

на диссертацию Мыльников Павла Юрьевича

«Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на

**функционирование гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере в
норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии»,**

**представленной на соискание учёной степени кандидата биологических
наук в диссертационный совет 24.1.183.01 при ФГБНУ НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова по специальности 3.3.6 –
фармакология, клиническая фармакология.**

Актуальность темы диссертационного исследования

В настоящее время фармакотерапия заболеваний, связанных с гипоксией головного мозга, является одной из ведущих проблем неврологической практики. Последствиями данных заболеваний могут быть инвалидизация или летальный исход, в частности, при инсультах. Наиболее часто для лечения подобных состояний используют лекарственные препараты из группы антиоксидантов и антигипоксантов, одним из которых является изученный в данной диссертационной работе этилметилгидроксипиридина сукцинат. Развитие гипоксии сопровождается реакцией многих органов и систем организма, что отражается как на острой фазе патологического процесса, так и на его последствиях. Современные исследования показывают неоднозначную роль факторов Nrf2 и HIF-1 α , рассмотренных в диссертационной работе, при гипоксии как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе, что свидетельствует о наличии неизученных в настоящее время свойств указанных транскрипционных факторов. Известно также, что фармакологические эффекты лекарственных веществ могут изменяться на фоне гипоксии, приводя либо к отсутствию ответа, либо к усилению эффекта до проявления

симптомов интоксикации. Причиной этого может быть изменение фармакокинетики лекарственных веществ и функциональной активности белков-транспортеров (например, гликопротеина-P), локализованных в тканевых барьерах, в т.ч. в гематоэнцефалическом барьере.

В диссертационной работе Мыльникова П.Ю. изучено влияние отечественного антиоксиданта этилметилгидроксипиридина сукцината на транскрипционные факторы HIF-1 α и Nrf2, а также эффлюксный белок-транспортёр гликопротеин-P в гематоэнцефалическом барьере как в норме, так и в условиях патологии - острой гипоксической гипобарической гипоксии, что является актуальным для современной фармакологии, клинической фармакологии и неврологии.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

В ходе выполнения диссертационной работы впервые в условиях *in vitro* была выявлена способность этилметилгидроксипиридина сукцината ингибировать функциональную активность гликопротеина-P; разработана и валидирована методика оценки функционирования гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере головного мозга крыс; подтверждено локальное ингибирующее влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на активность гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере в эксперименте на животных; показано повышение локальной активности исследуемого белка-транспортёра при гипоксии и устранение данного эффекта при профилактическом введении этилметилгидроксипиридина сукцината; показано, что ни острое, ни хроническое воздействие исследуемого вещества не приводит к изменению относительного количества в головном мозге транскрипционных факторов HIF-1 α и Nrf2 в норме, но вызывает выраженное увеличение относительного количества Nrf2 при гипоксии.

Результаты диссертационной работы Мыльникова П.Ю. имеют высокую значимость с научно-практической точки зрения. В ходе работы было подтверждено, что гипоксия приводит к увеличению активности

гликопротеина-Р в головном мозге, и установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат снижает функциональную активность гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере крыс. Данный результат может объяснять изменение фармакологического эффекта лекарственных препаратов при гипоксических состояниях головного мозга, а также вследствие медикаментозной коррекции этой патологии. Также было показано, что при гипоксии назначение исследуемого лекарственного препарата препятствует повышению уровня HIF-1 α и дополнительно стимулирует увеличение количества важного транскрипционного фактора Nrf2, участвующего в формировании антиоксидантной защиты клеток, препятствующей их дальнейшему повреждению и, таким образом, способствуя уменьшению повреждения тканей.

Необходимо отметить, что для решения поставленных в ходе работы задач, была разработана оригинальная методика оценки функциональной активности гликопротеина-Р локально в гематоэнцефалическом барьере, что отражено в соответствующем патенте (Патент России №RU 2677286 С1. 2019).

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, содержащихся в диссертации

Результаты представленной диссертационной работы получены в процессе проведения грамотно спланированной и выполненной в соответствии с современными требованиями исследовательской работы. Анализ биологических образцов проводился с использованием современного оборудования, применённые аналитические методики были надлежащим образом валидированы, а полученные данные проходили процесс адекватной статистической обработки на соответствующем программном обеспечении.

В разделе, посвящённом обсуждению полученных результатов, приведена их интерпретация с применением для подкрепления теоретических выкладок данных литературы, выборка которых осуществлена

за широкий промежуток времени, в том числе включая и актуальные (за последние 5 лет) данные научных статей.

Научные положения, выводы и практические рекомендации соотносятся с результатами диссертации и являются логически связанными с ней. Выводы диссертационной работы полностью соответствуют поставленным задачам.

Общая характеристика работы

Диссертация Мыльникова П.Ю. имеет стандартную структуру оформления, соответствующую предъявляемым к данному виду работ требованиям. Диссертационная работа изложена на 138 страницах и включает в себя такие главы, как введение, обзор литературы (26 стр.), материалы и методы исследования (14 стр.), результаты (42 стр.), обсуждение полученных результатов (10 стр.), выводы (2 стр.), практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы (1 стр.), список сокращений (2 стр.) и список литературы (25 стр.). Диссертационная работа снабжена 31 рисунком, 14 таблицами, наглядно представляющими изложенный материал. Список литературы включает в себя 246 источников, из которых 66 источников отечественной и 180 источников зарубежной литературы.

В разделе «Введение» рассмотрены такие вопросы, как актуальность работы, степень разработанности проблемы, цели, задачи исследования. Указана научная новизна работы, её теоретическое и практическое значение, приведена общая методология исследования, положения, выносимые на защиту, обоснование степени достоверности. Раздел имеет также указание на проведённую ранее апробацию диссертационной работы и на внедрение её результатов в практическую деятельность. Указаны вклад автора в выполнение работы, сведения о публикациях по теме диссертации и её общая структура с указанием количества использованных литературных источников.

В разделе «Литературный обзор» полно и наглядно представлены научные данные, касающиеся рассматриваемых в данной диссертационной работе объектов: достаточно подробно описана структура гематоэнцефалического барьера и сопровождается иллюстративным материалом, что хорошо поясняет приведённые в тексте данные. Приведены современные сведения о фармакологических свойствах изучаемого лекарственного препарата - этилметилгидроксипиридина сукцината. Рассматриваемые в рамках диссертации транскрипционные факторы HIF-1 α и Nrf2 охарактеризованы преимущественно с точки зрения их взаимосвязи с гипоксией и окислительным стрессом.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны методология и дизайн исследования, используемое материально-техническое оснащение, способы расчёта и выражения полученных результатов, а также порядок их статистической обработки. Помимо самих методов исследования в разделе указаны и параметры их пригодности к использованию, в частности, приведена полная валидация примененной хроматографической методики. Автор указал в работе порядок иммуногистохимического окрашивания полученных образцов мозга и способ их инструментальной обработки с помощью специализированных программ.

В разделе «Результаты» полно представлены полученные в ходе исследовательской работы данные, которые представлены в виде таблиц. В части, посвящённой исследованиям *in vitro*, продемонстрированы результаты как для исследуемого препарата – этилметилгидроксипиридина сукцината, так и для соответствующего препарата сравнения – верапамила, обладающего известным ингибирующим действием на функциональную активность гликопротеина-P, что подтверждается в ходе эксперимента и свидетельствует о корректности выполняемых манипуляций и используемой экспериментальной модели.

В следующей части приводится описание разработки оригинальной методики оценки функциональной активности гликопротеина-P в

гематоэнцефалическом барьере головного мозга крыс, которая также подвергается процессу валидации, доказывающей ее корректность.

В последующих разделах описано изучение влияния этилметилгидроксипиридина сукцината на активность и относительное количество гликопротеина-Р в условиях нормы, а далее – в условиях экспериментальной модели гипоксии. После изучения влияния рассматриваемых факторов по отдельности на белок-транспортёр, автор рассматривает их сочетанное воздействие, при этом все указанные и выявленные различия имеют высокую степень достоверности, подтвержденную методами статистическими анализа.

Последней группой результатов представлено влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на транскрипционные факторы HIF-1 α и Nrf2 в условиях нормы и в условиях гипоксии, в также при введении изучаемого препарата в аналогичных условиях. Для подтверждения адекватности воспроизводимой модели гипоксии представлен биохимический анализ оксидативного статуса ткани мозга, который показывает степень повреждения мозга при моделировании гипоксии у животных.

В разделе «Обсуждение полученных результатов» Мыльников П.Ю. соотносит полученные в ходе исследовательской работы результаты с уже имеющимися литературными данными, подтверждающими сделанные автором заключения. Также в данном разделе продемонстрирована возможная взаимосвязь химической структуры исследуемого лекарственного препарата с его ингибирующим влиянием на функциональную активность гликопротеина-Р. Полученные результаты в данном разделе адекватно и логично интерпретированы, а также подкреплены теоретическими выкладками научных статей разных авторов.

Выводы диссертации полностью соответствуют поставленным задачам исследования, при этом сформулированы логично, последовательно и конкретно, представляя собой обобщённые результаты исследования.

Автореферат оформлен в соответствии с современными требованиями и полностью соответствует диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в 10 печатных работах, из которых 3 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 2 из них входят в международные базы данных (Scopus и Web of Science). По итогам работы оформлен 1 патент.

Принципиальных замечаний по структуре диссертации, использованным материалам и методам, изложению полученных результатов и содержанию работы нет.

В плане обсуждения результатов хотелось бы прояснить следующие вопросы:

1. В диссертации не уточнено, откуда появилась изучаемая доза этилметилгидроксипиридина сукцината для внутривенного введения?
2. Какая барокамера применялась для воспроизведения модели гипоксической гипоксии?
3. Почему экспериментальные группы формировались из 5 животных?

Заключение

Диссертационная работа Мыльников Павла Юрьевича «Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на функционирование гликопротеина-P в гематоэнцефалическом барьере в норме и при острой гипоксической гипобарической гипоксии» является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, которая содержит решение актуальной научной задачи изучения действия этилметилгидроксипиридина сукцината в условиях нормы и острой гипоксии на белок-транспортёр гликопротеин-P в гематоэнцефалическом барьере и транскрипционные факторы HIF-1 α и Nrf2, имеющей существенное значение для фармакологии, клинической фармакологии.

По новизне, научно-практической значимости, актуальности, качеству выполненных исследований и сделанных выводов диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Мыльников Павел Юрьевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология.

Преподаватель кафедры фармакологии
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская
академия имени С.М. Кирова» МО РФ,
доктор биологических наук, доцент

Марышева Вера Васильевна

« 9 » марта 2022 г.

Санкт-Петербург, 194044, ул. Академика Лебедева 6; тел.: +7(911)984-36-53;
e-mail: vvmarysheva@yandex.ru

Подпись Марышевой В.В. заверяю

Начальник научного отдела
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская
академия имени С.М. Кирова» МО РФ

« 9 » марта 2022г.



А.О. Сазонов