

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, руководителя отдела нейropsychофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Татьяны Александровны Ворониной на диссертационную работу Пелагеи Дмитриевны Ананьевой на тему «Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам активности OATP1B1 *in vitro*», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).

Актуальность темы исследования

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) – оригинальный отечественный препарат (первое товарное название мексидол), был создан в НИИ фармакологии РАМН и более 25 лет успешно применяется в лечебной практике. ЭМГПС является препаратом с широким спектром эффектов, прежде всего, антиоксидантным, противогипоксическим, противоишемическим, и часто назначается в составе комбинированной терапии. Фармакодинамика и фармакокинетика ЭМГПС достаточно подробно изучены в доклинических и клинических исследованиях и, в частности, показано, что ЭМГПС подвергается интенсивному метаболизму в печени.

В начале 2000 г.г. тремя независимыми научными группами из печени человека был выделен белок, который впоследствии получил название полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1). Он был отнесен к группе SLC-белков (Solute carrier transporters), которые транспортируют субстраты за счет разности электрохимических потенциалов или ионного градиента, не используя при этом энергию АТФ. Было показано, что этот белок - OATP1B1 экспрессируется преимущественно в печени и участвует в переносе веществ-субстратов через билипидную мембрану внутрь гепатоцитов, где они впоследствии подвергаются биотрансформации.

Поскольку ЭМГПС подвергается интенсивному метаболизму в печени, логичным шагом является оценка участия OATP1B1 в транспорте ЭМГПС в

гепатоциты, то есть тестирование препарата на принадлежность к субстратам транспортера. Показано, что некоторые препараты (например, рифампицин) могут влиять (снижать или повышать) на активность OATP1B1, что, в свою очередь, может повлиять на проникновение внутрь гепатоцита субстратов транспортера. А это может привести или к повышению плазменной концентрации субстрата (при ингибировании OATP1B1) и развитию относительной передозировки, или к снижению его содержания (при индукции OATP1B1) и уменьшению эффективности проводимой терапии.

Учитывая то обстоятельство, что ЭМГПС часто назначается в составе комбинированной терапии, для повышения ее эффективности и безопасности и прогнозирования возможности развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий важно знать, влияет ли ЭМГПС на активность OATP1B1.

Таким образом, исследование П.Д. Ананьевой «Оценка принадлежности ЭМГПС к субстратам и модуляторам активности OATP1B1 *in vitro*» имеет высокую степень актуальности, научной новизны и практической значимости.

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

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертационной работы П.Д. Ананьевой не вызывают сомнений. Проведенное исследование представляет собой комплексную работу, выполненную на высоком научно-методическом уровне.

В работе использованы современные методы исследований такие, как трансфекция, ПЦР в реальном времени, ВЭЖХ-МС/МС, вестерн-блоттинг, конфокальная микроскопия.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием адекватных методик с помощью специализированного программного обеспечения.

Сформулированные автором положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации полностью подтверждаются проведенным исследованием и соответствуют поставленной цели и задачам.

Решение поставленной в диссертационном исследовании проблемы представляется методологически оправданным и корректным.

Личный вклад автора

Автором работы самостоятельно проведен аналитический обзор отечественных и зарубежных публикаций по теме диссертации, разработана методология и дизайн экспериментов. Диссертант лично выполнила все эксперименты *in vitro* и все молекулярно-генетические, биохимические и аналитические исследования, а также провела обработку полученных результатов, сформулировала выводы и практические рекомендации.

Научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость работы

Диссертация Ананьевой П.Д. имеет высокую степень научной новизны, научно-практическую и научно-теоретическую значимость. Научная новизна работы заключается в том, что автором впервые в России разработана рекомбинантная клеточная линия, гиперэкспрессирующая полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (OATP1B1) и налажена методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности OATP1B1. С использованием разработанной линии клеток и методики тестирования было установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не является субстратом OATP1B1, но проявляет ингибирующую активность в его отношении. На клеточной линии гепатоцитов было установлено, что изменение экспрессии гена *SLCO1B1* не является основным механизмом регуляции OATP1B1, так как гиперэкспрессия гена не приводит к эквивалентному увеличению уровня белка.

Теоретическая и практическая значимость исследования заключаются в установлении факта, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не является

субстратом OATP1B1, не влияет на количество транспортера, однако, ингибирует его активность в высоких концентрациях (существенно выше плазменных), что свидетельствует о том, что данный препарат является безопасным в плане развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне OATP1B1, то есть может длительно совместно применяться с субстратами/ингибиторами данного транспортера.

Автором также были разработаны методики ВЭЖХ-МС/МС анализа концентраций этилметилгидроксипиридина и аторвастатина. Данные методики являются чувствительными, селективными, точными и прецизионными и пригодны для количественного определения данных веществ в биологических образцах.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», а также в активно используются в ходе работы лаборатории клеточных технологий НЦИЛС ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России», ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова Минздрава России».

Апробация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, отражающих основные результаты диссертации, в т.ч. 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из которых в журналах, включенных в международные базы данных SCOPUS и Web of Science – 4 статьи.

Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций различного уровня (региональных, российских и международных).

Оценка структуры, содержания диссертации, ее завершенности

Диссертация П.Д. Ананьевой изложена на 119 страницах

машинописного текста. Работа построена по классическому принципу и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 21 рисунком и 15 таблицами. Список литературы представлен 178 источниками, из которых 57 источников отечественной и 121 источник зарубежной литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, описывает научную новизну, освещает теоретическую и практическую значимость работы.

Цели и задачи проведенного исследования соответствуют тематике и полностью отражены и раскрыты в тексте работы. Научные положения, вынесенные на защиту, выверены и актуальны, материалы и методы полностью соответствуют поставленной цели и сформулированным задачам, современные и информативные, а степень обоснованности полученных результатов не вызывает сомнений.

Первая глава посвящена обзору отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Автор подробно описала структуру транспортера, предполагаемый транспортный цикл, привела перечень наиболее клинически значимых субстратов и известных модуляторов активности белка. Отдельно стоит отметить раздел о механизмах регуляции белка-транспортера, который автор описала глубоко и подробно. Также подробно описан раздел о роли OATP1B1 в развитии межлекарственных взаимодействий. Данный раздел подчеркивает актуальность выбранной темы и ее важность для фармакологии и медицины. Автором обоснован выбор в качестве объекта исследования этилметилгидроксипиридина сукцината – детально описаны его фармакокинетика, фармакологические эффекты, области применения. Стоит отметить, что диссертант привела результаты хемореактомного анализа

молекулы препарата, что позволило оценить этилметилгидроксипиридина сукцинат как потенциальный объект межлекарственных взаимодействий. Глава заканчивается формулировкой научной проблемы и логично обосновывает необходимость и своевременность проведения настоящего диссертационного исследования.

В главе «Материалы и методы» представлена методология использованного подхода к оценке принадлежности лекарственных средств к субстратам и модуляторам активности OATP1B1. Комплексность проведенного исследования заключается в использовании и комбинировании современных высокотехнологичных методов исследования – генной инженерии, полимеразной цепной реакции в реальном времени, высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием, вестерн-блот анализ. Выбранные автором методы исследования адекватны сформулированной цели диссертационной работы.

Результаты исследования, приведенные в главе 3, соответствуют цели работы и сгруппированы в соответствии с задачами исследования. Полученные автором результаты проиллюстрированы рисунками, графиками и фотографиями, что позволяет получить полноценное комплексное представление о проделанной автором работе.

Всю выполненную работу можно разделить на три этапа. В рамках выполнения первого этапа с помощью трансфекции была создана клеточная линия HEK293-OATP1B1, селективно гиперэкспрессирующая изучаемый транспортер. На основе созданной клеточной линии был разработан метод тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности OATP1B1. Кроме того, были разработаны методы количественного анализа аторвастатина (классического субстрата OATP1B1) и ЭМГПС. Разработанные биоаналитические методики являются чувствительными, селективными, точными и прецизионными и могут быть использованы для оценки проникновения данных веществ внутрь клеток.

На втором этапе оценивалась принадлежность ЭМГПС к субстратам и модуляторам OATP1B1 с помощью разработанного метода. Было показано, что тестируемый препарат не является субстратом OATP1B1, не влияет на его количество, но обладает способностью ингибировать его активность.

На заключительном третьем этапе исследования проводилась оценка клинической значимости полученных результатов. Для этого автором было рассчитано отношение максимальной плазменной концентрации препарата к концентрации полумаксимального ингибирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние изучаемого препарата на активность OATP1B1 у пациентов не является клинически значимым. Совместное применение ЭМГПС с субстратами OATP1B1 не будет приводить к развитию межлекарственных взаимодействий и, соответственно, побочным эффектам препаратов, связанных с их накоплением в крови пациентов. При этом, согласно международным рекомендациям, дополнительные клинические исследования для подтверждения полученных результатов проводить не требуется. В заключении кратко обобщены основные этапы и итоги проведенного исследования.

Выводы следуют из содержания работы, сформулированы чётко и соответствуют поставленной цели и задачам.

Практические рекомендации являются адресными и представляют интерес для практикующих врачей и фармацевтических компаний, разрабатывающих новые лекарственные средства.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания по диссертации

Принципиальных замечаний к диссертации П.Д. Ананьевой нет. Изложение материала исследования хорошее, хотя по тексту встречаются единичные опечатки.

В формате дискуссии предлагается обсудить следующие вопросы:

В работе убедительно показано, что ЭМГПС не является субстратом OATP1B1, не влияет на количество транспортера, однако ингибирует его

активность в высоких концентрациях и полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭМГПС является безопасным в плане развития фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне OATP1B1, то есть может длительно совместно применяться с субстратами/ингибиторами данного транспортера. Возникают вопросы:

1) Каков предполагаемый механизм и индукции экспрессии SLCO1B1 под действием препарата?

2) Почему экспрессия гена не приводит к увеличению уровня белка OATP1B1?

3) На принадлежность к субстратам каких транспортеров необходимо дополнительно изучить ЭМГПС для комплексной оценки риска развития межлекарственных взаимодействий?

Заключение

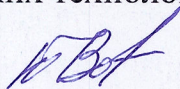
Диссертационная работа Пелагеи Дмитриевны Ананьевой на тему «Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам активности OATP1B1 *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки), является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи по оценке принадлежности российского препарата этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам активности OATP1B1 и прогнозированию развития межлекарственных взаимодействий с его участием на уровне транспортера OATP1B1, имеющей существенное значение для современной фармакологии и медицины.

Диссертация соответствует п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (в ред. от 25.01.2024 г.) по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки), а Ананьева Пелагея

Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).

Официальный оппонент

Доктор медицинских наук, профессор,
руководитель отдела нейрпсихофармакологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических технологий»



Воронина Т.А.

Подпись доктора медицинских наук, профессора, руководителя отдела нейрпсихофармакологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» Ворониной Татьяны Александровны заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,

кандидат биологических наук



Васильева Е.В.

« 22 » октября 2024 года

Контактная информация

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных
биомедицинских и фармацевтических технологий»
125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8. Тел.: +7(499)151-18-81. E-mail:
info@academpharm.ru