

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Воробьевой Виктории Владимировны на диссертационную работу Трановой Юлии на тему «Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP *in vitro*» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Актуальность темы

Развитие осложнений при проведении фармакотерапии может быть связано с фармакокинетическими межлекарственными взаимодействиями на уровне белков-транспортеров, к которым, в частности, относится белок резистентности рака молочной железы (BCRP, ABCG2) – эффлюксный трансмембранный белок, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров. Белок BCRP в организме человека выполняет защитные функции, участвует в абсорбции большого количества лекарственных веществ, их распределении и удалении из организма. Воздействие ряда лекарственных веществ может модулировать активность белка BCRP. Ингибиторы белка-транспортера снижают его функциональную активность, что может повысить риск возникновения нежелательных лекарственных реакций. Индукторы повышают активность белка, что ухудшает фармакотерапию в следствии снижения концентрации вещества-субстрата. В настоящее время зарубежные и отечественные регуляторные организации рекомендуют определять принадлежность новых лекарственных средств к субстратам и модуляторам активности белков-транспортеров *in vitro* и, в случае положительных результатов, – *in vivo*.

Таким образом, диссертационное исследование Трановой Ю., целью которого явилась разработка и апробация методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка BCRP на клетках Caco-2, является весьма актуальной.

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационной работы подтверждается тем, что автором разработаны и валидированы по требованиям, предъявляемым к биоаналитическим экспериментам, методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина методом ВЭЖХ-МС/МС в транспортной среде; оценен транспорт метотрексата, митоксантрона и кверцетина через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 для выбора оптимального субстрата разрабатываемой методики. Показано, что метотрексат в концентрации 5 мкМ и митоксантрон в концентрации 10 мкМ являются наиболее подходящими субстратами BCRP в используемых условиях транспортного эксперимента на клетках линии Сасо-2. С помощью разработанной методики установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат в экспериментах *in vitro* не является субстратом BCRP, но является ингибитором белка-транспортера, однако не меняет количество BCRP в клетках линии Сасо-2.

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

Научно-методические подходы, используемые автором при планировании, выполнении и интерпретации результатов экспериментального исследования соответствуют современным требованиям, предъявляемым к работам медико-биологического профиля.

Всесторонний анализ данных и адекватные методы статистической обработки делают убедительными полученные результаты и полностью обосновывают основные положения работы с вытекающими из них выводами и практическими рекомендациями.

Выводы подтверждены достаточным количеством экспериментальных данных, полученных с помощью современных и точных методов исследования. Достоверность результатов, выводов и положений не вызывает

сомнений и подтверждается адекватным дизайном исследования, достаточным объемом материала, обоснованным выбором методов обработки информации. Полученные результаты сопоставлены с данными других исследователей, рационально интерпретированы, изложены в положениях, выносимых на защиту, выводах и практических рекомендациях.

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

Значимость полученных результатов для науки и практики

Работа имеет существенное практическое и научное значение, поскольку автором была разработана методика *in vitro*, позволяющая определить фармакокинетические характеристики лекарственных веществ, а именно их принадлежность к субстратам и/или модуляторам активности белка-транспортера BCRP, снижающего всасывание в кишечнике лекарственных веществ и участвующего в их выведении с желчью и мочой. Разработанная методика *in vitro* позволила установить принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината - отечественного оригинального препарата - к ингибиторам BCRP, что следует подтвердить в опытах *in vivo*.

Валидированные методики ВЭЖХ-МС/МС позволяют анализировать количество метотрексата, митоксантрона и кверцетина в широких диапазонах концентраций.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Разработанная в рамках диссертации методика имеет большой потенциал использования в доклинических исследованиях *in vitro* для тестирования принадлежности лекарственных веществ к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP.

Теоретические положения и практические рекомендации могут быть использованы в учебном процессе при подготовке кадров высшей квалификации и внедрены в деятельность научно-исследовательских центров.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности. Структура и оформление работы

Диссертация представлена на 146 страницах машинописного текста. Работа имеет следующие разделы и главы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы (209 источников). Диссертационная работа содержит 38 рисунков и 21 таблицу.

Введение диссертационной работы включает в себя все регламентированные ГОСТ 7.0.11-2011 основные структурные элементы. В данном разделе автором последовательно и подробно описаны актуальность темы исследования и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, описаны положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов. Также раздел содержит сведения о внедрении результатов исследования в практику и личном вкладе автора. Во введении указаны сведения о публикациях по теме исследования, структура и объем диссертационной работы и благодарности.

В главе 1 «Обзор литературы» обширно и развернуто представлена информация о белке резистентности рака молочной железы (BCRP) с использованием современных отечественных и зарубежных источников. Теоретический раздел включает в себя сведения об истории открытия BCRP, данные о структуре, локализации и основных функциях белка. Также в обзоре литературы подобно охарактеризованы субстраты, ингибиторы и

индукторы BCRP и известные методики тестирования веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP. Количество и набор проанализированных источников свидетельствуют о достаточной степени погруженности автором в описываемую проблему.

Глава 2 «Материалы и методы исследования» содержит информацию об объекте исследования и способе культивирования клеточной линии. Количественное определение анализируемых веществ проводилось современным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, что указывает на точность и прецизионность полученных результатов. Методология и методы исследования соответствуют его цели и задачам. Подробно описываются примененные в работе современные аналитические методы исследования, транспортные эксперименты, анализ вестерн-блот, манипуляции с клеточной культурой. В качестве субстратов BCRP автор протестировал метотрексат, митоксантрон и кверцетин в широком диапазоне концентраций; в качестве ингибитора BCRP использовался резерпин.

Для статистической обработки применялись современные и адекватные методы обработки данных, что является залогом высокой достоверности полученных результатов.

В главе 3 представлены результаты исследования, которые соответствуют его цели и последовательно изложены в соответствии с задачами работы. Значительное количество полученных автором собственных результатов в достаточной мере проиллюстрировано таблицами, графиками, что позволяет получить целостное представление о выполненной работе.

В главе 4 «Заключение» автор проводит сопоставление полученных в исследовании данных с отраженным в зарубежных и отечественных литературных источниках современным состоянием вопроса, выявляя основные тенденции и объясняя полученные результаты.

Выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют поставленным задачам и подкрепляются полученными результатами.

В целом диссертационная работа Трановой Юлии производит исключительно положительное впечатление, соответствует требованиям ВАК по оформлению кандидатской диссертационной работы. Однако в процессе ее рецензирования возникли следующие замечания и вопросы.

Замечания:

1. На странице 42 текста диссертации автор указывает на стабильность образцов в процессе заморозки при -80°C , но не указывает критериев стабильности.
2. Пересчет количества транспортера проводился на общее содержание белка по методу Брэдфорта, однако цифровые значения количества белка на единицу объема отсутствуют.
3. В тексте диссертации отсутствует единообразие в обозначении единиц измерения различных параметров согласно международной системе единиц.

Вопросы:

1. Автор отмечает, что в клетках аденокарциномы ободочной кишки человека Caco -2 наблюдается образование как мономера BCRP с атомной единицей массы 75 кДа, так и его димера с массой 150 кДа. Какое соотношение между мономерами и димерами обнаружено к 21 дню инкубации и влияет ли оно на общую активность изучаемого белка-транспортера?

2. Во время транспортного эксперимента осуществляли забор проб через 1, 2, 3 часа, однако по формуле, рассчитывающей транспорт тестируемых веществ из базолатеральной в апикальную камеру, значения коэффициента кажущейся проницаемости были рассчитаны на основе одного временного момента, соответствующего 3 часам. Обоснуйте целесообразность подобных математических расчетов?

3. Автор ссылается на рекомендации Управления по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США, в которых отражена необходимость тестирования лекарственных препаратов на принадлежность к субстратам или ингибиторам семейств белков-транспортеров. А каковы наши национальные рекомендации? Имеются ли регламентирующие документы?

4. Автор упоминает о сокращении материальных затрат на проведение доклинических испытаний *in vitro* лекарственных средств с использованием предложенной методики тестирования на принадлежность к субстратам или ингибиторам семейств белков-транспортеров. Имеются ли расчеты, подтверждающие подобные утверждения?

В целом, приведенные замечания несколько не умаляют достоинств диссертационного исследования.

Личный вклад автора

Автором подготовлен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы и написан обзор литературы; проведены транспортные эксперименты на клетках Caco-2; разработаны и валидированы методики количественного анализа; проанализированы полученные результаты и представлены в печатных изданиях и на научных конференциях.

Публикации по теме диссертации

Результаты работы отображены в 5 печатных работах, из них 4 статьи рецензируются в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus. Полученные данные представлены на 4 конференциях международного и российского уровня.

Заключение

Диссертация Трановой Юлии на тему «Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP *in vitro*», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение научной задачи тестирования принадлежности лекарственных веществ к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP с помощью разработанной методики, что имеет существенное значение для фармакологии и клинической фармакологии. По актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Транова Юлия, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Старший преподаватель кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», доктор медицинских наук

«14» февраля 2024 г

В.В. Воробьева

Подпись В.В. Воробьевой заверяю:



Адрес: 194044, г. Санкт-Петербург ул. Академика Лебедева, д. 6, литера Ж, ФГБВОУ ВО
Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, кафедра фармакологии.

Телефон: 8 (812) 292-32-55

Email: vmeda-na@mail.ru