

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Оковитого Сергея Владимировича 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 диссертационной работы

Актуальность темы диссертационной работы определяется ролью трансмембранного АТФ-зависимого белка суперсемейства ABC-транспортеров – белка резистентности рака молочной железы (BCRP) - в абсорбции лекарственных веществ-субстратов, их распределении в тканях и органах и экскреции с желчью и мочой. Изменение функционирования белка-транспортера может вызывать вариабельность концентрации его субстратов в крови, что в ряде случаев приводит к неэффективности проводимой фармакотерапии или к риску передозировки и развитию нежелательных лекарственных реакций.

Учитывая вышеизложенное, актуальной задачей является тестирование фармакологических агентов *in vitro* на этапе доклинических исследований на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP. Это требует разработки оптимальной методики *in vitro*, выбора тест-системы, субстратов и ингибиторов BCRP, определения их концентрации, разработки и валидации методов количественного анализа субстратов, апробации методики. Представленная работа направлена на решение этой практической задачи в области фармакологии и клинической фармакологии.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, характеризуется основательной проработкой научной литературы, использованием современных методов исследования, соответствующих поставленным задачам, в ее основе лежит всесторонний анализ и системный

подход к изучению проблемы. Проведенная статистическая обработка полученных в эксперименте данных позволяет считать результаты убедительными, а основные положения работы и сделанные в ее ходе выводы полностью обоснованными. Выводы и практические рекомендации по результатам диссертационного исследования сформулированы на основании достаточного объема данных, полученных с использованием валидированных методик.

Достоверность результатов, выводов и положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений и подтверждается корректным планом исследования, достаточным объемом выборки в каждом конкретном эксперименте, а также рациональным выбором методов статистической обработки данных.

Полученные в ходе исследования результаты сопоставлены с имеющимися литературными данными, объективно интерпретированы, корректно изложены в основных положениях, выносимых на защиту, выводах и практических рекомендациях.

Следует отметить, что представленная работа носит мультидисциплинарный характер, касаясь не только вопросов фармакологии (п.6 паспорта научной специальности 3.3.6. - Фармакология, клиническая фармакология «Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств»), но и фармацевтической химии.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертантом проведена серия экспериментов на клеточной линии Сасо-2 и получены данные о транспорте метотрексата, митоксантрона и кверцетина через билипидную мембрану клеточной линии, а также оценен транспорт метотрексата и митоксантрона в присутствии ингибитора BCRP. По количественным характеристикам субстратов, полученных с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, выбраны оптимальные концентрации

метотрексата (5 мкМ) и митоксантрона (10 мкМ), позволяющие проводить опыты *in vitro* и предложены условия проведения эксперимента.

Количество метотрексата, митоксантрона и кверцетина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием по разработанным и валидированным параметрам: селективность, предел количественного определения, линейность, правильность (внутри и между циклами), прецизионность (внутри и между циклами), перенос пробы, матричный эффект и стабильность, что подтверждает достоверность и точность полученных результатов.

В работе с помощью разработанной методики оценена принадлежность отечественного оригинального лекарственного препарата – этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГС), к субстратам и модуляторам активности BCRP. Установлено, что ЭМГС не является субстратом BCRP, но способен ингибировать его активность. Этилметилгидроксипиридина сукцинат не влияет на количество BCRP, оцененное методом вестерн-блот.

Достоверность полученных результатов и выводов подкрепляется правильной выборкой и адекватными методами статистического анализа экспериментальных данных, наряду с корректной интерпретацией результатов диссертационного исследования.

Научно-практическая значимость

Разработанная в исследовании методика является релевантной и может быть рекомендована к дальнейшему использованию при тестировании лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP *in vitro*, в частности, новых и широко применяющихся отечественных оригинальных препаратов для получения информации о возможности возникновения межлекарственных взаимодействий на уровне белка-транспортера BCRP. В работе установлено, что ЭМГС ингибирует

BCRP и не относится к его субстратам, что дополняет фармакологическую характеристику препарата.

Разработанные в диссертации методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина позволяют использовать их в анализе концентрации веществ в транспортной среде. Возможна модификация разработанных методик для определения уровня метотрексата, митоксантрона и кверцетина в биологических жидкостях, тканях и фармацевтических препаратах.

В работе определено относительное количество белка BCRP в пробах современным и специфическим методом – вестерн-блотом, что позволило установить предположительные механизмы ингибирования и/или индукции белка-транспортера в экспериментах. Выявлено, что ЭМГС, ингибируя BCRP, не изменяет его количество в клетках Caco-2.

Полученные в работе данные и разработанная экспериментальная методика тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности BCRP могут быть применены в исследовательской и лабораторной практике в рамках проведения доклинических исследований лекарственных средств, направленных на изучение их фармакокинетических параметров, механизмов абсорбции, прогнозирования межлекарственных взаимодействий.

Теоретические положения и практические рекомендации могут быть использованы в последующей научной работе, а также при подготовке научно-исследовательских кадров по специальности фармакология, клиническая фармакология.

Оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа изложена на 146 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 38 рисунками

и 21 таблицей. Список литературы представлен 209 источниками, из них 15 отечественных и 194 зарубежных авторов.

Во введении автор дает обоснование актуальности темы работы, указывает степень разработанности проблемы, определяет цель и задачи исследования, представляет научную новизну теоретическую и практическую значимость работы, а также формулирует положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор отечественной и зарубежной литературы. В нем изложены история открытия BCRP, современные сведения о структуре, функционировании и локализации BCRP, описаны субстраты, ингибиторы и индукторы белка-транспортера, рекомендованные методы тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP.

Во второй главе описаны материалы и методы, применяемые в исследовании. Работа состояла из разработки методик количественного анализа субстратов с использованием ВЭЖХ-МС/МС, модификации методики количественного определения ЭМГС методом ВЭЖХ-УФ и экспериментов *in vitro* на клетках линии Caco-2.

В третьей главе приведены полученные результаты исследования. Особенно стоит подчеркнуть, что в третьей главе представлена подробная валидация разработанных хроматографических методик, что указывает на высокую достоверность полученных результатов.

В главе «Заключение» автор подводит итоги работы, далее формулирует выводы и практические рекомендации, а также оценивает перспективы дальнейшей разработки темы. Выводы полностью отражают результаты исследования, отличаются четкостью и обоснованностью.

Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы ясно и четко, полностью соответствуют цели и задачам исследования. Выводы и практические рекомендации обоснованы, органично следуют из материалов исследования и свидетельствуют о достижении цели работы.

Автореферат полностью отражает все основные положения, этапы и результаты диссертационного исследования.

В целом, работа выполнена на высоком методическом и методологическом уровне, что подтверждается широким спектром различных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Поставленную цель в диссертационной работе следует считать достигнутой благодаря корректной методической основе, полученные результаты, обладающие научной новизной, – весьма убедительными, а сформулированные по результатам исследования выводы – аргументированными.

Полнота изложения полученных результатов

По результатам диссертации опубликовано 5 статей, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в международные цитатно-аналитические базы Web of Science и Scopus и 4 тезиса докладов в материалах всероссийских и международных конференций.

Основные замечания и вопросы по диссертационной работе

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. В ходе рецензирования диссертационной работы возникли следующие вопросы, требующие дополнительного пояснения и уточнения:

1. Чем отличаются разработанные методики определения фармакологических агентов от фармакопейных?
2. Какие конкретные клинические рекомендации следуют из обнаруженной у этилметилгидроксипиридина сукцината способности ингибировать BCRP, являющегося еще и блокатором гликопротеина-P?

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, в которой содержится решение задачи разработки и апробации, на примере этилметилгидроксипиридина сукцината, методики тестирования лекарственных веществ на взаимодействие с ABC-транспортером BCRP, имеющей значения для фармакологии и клинической фармакологии. Диссертационная работа Трановой Юлии полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции постановления Правительства РФ от 18.03.2023 г. № 415), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Транова Юлия, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук профессор

05 февраля 2024 года

 С.В. Оковитый

Адрес: 197376, Санкт-Петербург; ул. Профессора Попова. 14, лит. А, тел. 8 (812) 499-39-00, ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, E-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com

Подпись руки



удостоверяю

05.02.2024

Начальник отдела документации

 Павлов И.Б.

ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

