

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор
Федерального государственного
автономного образовательного
учреждения высшего образования Первый
Московский государственный
медицинский университет имени И.М.
Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский
Университет),

член-корреспондент РАН

д.м.н., профессор

А.А. Свистунов

2024 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) на диссертационную работу Трановой Юлии на тему: «Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6 -фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы выполненной работы

В настоящее время исследование процессов биотрансформации и транспортных систем организма является важной научной-практической задачей, позволяющей более глубоко изучить фармакокинетику лекарственных веществ и оптимизировать фармакотерапию ряда заболеваний. Суперсемейство ABC-транспортеров играет существенную роль в транспорте ксенобиотиков, процессах всасывания, распределения и выведения лекарственных веществ из организма, реализации нежелательных межлекарственных взаимодействий и развитии феномена фармакорезистентности. Одним из важных представителей данного суперсемейства является белок резистентности рака молочной железы (BCRP). Значимость этого транспортера заключается в наличии широкого спектра лекарственных веществ, которые являются его субстратами либо модуляторами активности. При этом большую актуальность приобретает задача исследования как новых, так и давно известных лекарственных веществ на предмет их принадлежности к субстратам, индукторам или ингибиторам белка резистентности рака молочной железы с целью

повышения эффективности фармакотерапии и снижения риска развития нежелательных лекарственных взаимодействий.

Учитывая вышеизложенное, цель диссертационного исследования Трановой Юлии – разработать и апробировать методику тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP на клетках аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) является актуальной и своевременной.

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

Высокая степень достоверности результатов не вызывает сомнений и достигнута хорошо спланированным экспериментом, применением высокоточных инструментальных методов анализа и следованием требованиям валидации для методик количественного химического анализа. Результаты проведенных экспериментальных исследований получены на достаточном материале, проанализированы адекватными методами статистического анализа, и для многих результатов достигнута достоверность при принятом уровне значимости.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Выводы диссертационного исследования четко сформулированы и соответствуют задачам исследования.

Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором разработаны и валидированы методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина (известных субстратов BCRP) методом ВЭЖХ-МС/МС, модифицирована и валидирована методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината методом ВЭЖХ-УФ в транспортной среде.

В транспортном эксперименте оценено проникновение метотрексата и митоксантрона в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ и кверцетина в концентрации 50 мкМ через билипидную мембрану клеток линии Caco-2.

В качестве оптимальных субстратов BCRP в использованных условиях транспортного эксперимента на клетках линии Caco-2 выделены метотрексат (5 мкМ) и митоксантрон (10 мкМ), которые рекомендуется применять для тестирования принадлежности лекарственных веществ к ингибиторам белка-транспортера.

Впервые показано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не относится к субстратам BCRP, однако ингибирует белок-транспортер. Ингибирование транспортера не связано со снижением уровня данного белка, т.к. этилметилгидроксипиридина сукцинат не изменяет относительное количество BCRP в клетках линии Caco-2.

Новизна исследования отражена в выводах и рекомендациях, приведенных в диссертации.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа написана по традиционному плану, изложена на 146 страницах, содержит 38 рисунков и 21 таблицу. Диссертация состоит из введения и трех глав, включает обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Список цитированной литературы содержит 209 наименований, в том числе 194 зарубежных публикации. Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне. Достоверность результатов исследования доказывается представленным материалом. Полученные результаты основаны на достаточном объеме экспериментальных данных. Методы исследования современные, информативны, соответствуют цели и задачам работы. Адекватный выбор методик статистической обработки полученных результатов придает выводам автора высокий уровень обоснованности.

Обзор литературных источников в достаточной степени охватывает все научные тенденции, посвященные теме исследования. Раскрыты и описаны структура, локализация и функции BCRP, его субстраты, ингибиторы и индукторы, методы тестирования веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белка-транспортера.

В главе, описывающей материалы и методы, полно и подробно дана характеристика клеточной линии Caco-2 и условия ее культивирования, методика транспортного эксперимента, в котором оценено участие BCRP в транспорте метотрексата, митоксантрона и кверцетина, описана методика тестирования этилметилгидроксипиридина сукцината на принадлежность к субстратам и/или модуляторам активности BCRP, методика определения относительного количества BCRP методом вестерн-блот. Более кратко описаны методики количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина методом ВЭЖХ-МС/МС и их валидация, т.к. они охарактеризованы и проиллюстрированы в главе 3 (результаты исследования), поскольку разработка указанных методик являлась одной из задач исследования.

В главе результатов исследования подробно рассмотрены и описаны полученные результаты. В подразделе 3.1 дано описание разработки и валидации методик количественного определения субстратов BCRP метотрексата, митоксантрона и кверцетина в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС. Для каждого препарата дано описание методики, указаны параметры хроматографирования и масс-спектрометрические параметры детектирования. Валидация биоаналитических методик выполнялась в соответствии с Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза по параметрам: селективность, предел количественного определения,

линейность, правильность, прецизионность, перенос пробы, матричный эффект и стабильность. Приведены иллюстрации и таблицы, подтверждающие валидационные параметры и аналитический диапазон методик. Разработанные методики характеризуются высокой чувствительностью.

В подразделе 3.2 изложены результаты изучения транспорта метотрексата, митоксантрона и кверцетина в концентрациях 1, 5, 10 и 50 мкМ через монослой клеток линии Сасо-2 в трансвелл-системе. Для метотрексата в концентрации 5 мкМ наблюдалась выраженная асимметрия трансцеллюлярного транспорта вещества. Для митоксантрона асимметрия транспорта, превышающая «2» наблюдалась при концентрациях 5, 10, 50 мкМ, максимальная – при концентрации 10 мкМ. При добавлении кверцетина в базолатеральную камеру трансвелл-системы в максимальной концентрации 50 мкМ вещество детектировалось в камере-реципиенте в количестве менее 1% от его содержания в камере-доноре, что свидетельствует о его низкой проницаемости через клеточный монослой. Полученные результаты подтверждены в экспериментах с использованием известного ингибитора BCRP – резерпина, т.к. в его присутствии транспорт изучаемых субстратов достоверно снижался. Таким образом, результаты исследования показали, что метотрексат (5 мкМ) и митоксантрон (10 мкМ) являются наиболее оптимальными субстратами BCRP в используемых условиях транспортного эксперимента на клетках линии Сасо-2.

В подразделе 3.3 приведено описание модификации методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината на основе ранее разработанных методик и ее валидация. Методика была адаптирована для использования на хроматографе «Стайер» (Россия), оснащенный УФ-спектрофотометрическим детектором.

Подраздел 3.4 посвящен описанию результатов апробации разработанной методики на примере отечественного антиоксиданта и антигипоксанта этилметилгидроксипиридина сукцината. Изучена принадлежность этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам активности BCRP в транспортном эксперименте на клетках линии Сасо-2. Обнаружены достоверные различия, сделаны соответствующие выводы. В качестве известного субстрата в эксперименте был выбран митоксантрон (10 мкМ). Установлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не является субстратом BCRP, но способен ингибировать его активность. Этилметилгидроксипиридина сукцинат не изменяет количество BCRP в клетках линии Сасо-2, установленное методом вестерн-блот, поэтому ингибирование транспортера не связано с изменением количества данного белка.

В главе 4 «Заключение» приведено обсуждение результатов исследования и их сопоставление с другими работами по данной тематике.

Выводы и рекомендации логично вытекают из содержания диссертации, отражают поставленные задачи, хорошо аргументированы. В

целом, работа представляет собой завершённое диссертационное исследование, имеющее научно-практическое значение.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Значимость для науки представляют результаты исследования, связанные с разработкой методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP *in vitro* на клетках линии Caco-2. Для указанной методики определены оптимальные субстраты, ингибитор, их концентрации и условия транспортного эксперимента. Разработанная автором методика позволяет тестировать вещества на принадлежность к субстратам BCRP и оценивать участие белка-транспортера в фармакокинетике как новых, так и известных лекарственных веществ. Разработанная методика была апробирована с использованием отечественного препарата - этилметилгидроксипиридина сукцината. В экспериментах *in vitro* было показано, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не относится к субстратам BCRP, но является его ингибитором. Полученные результаты позволяют считать этилметилгидроксипиридина сукцинат безопасным препаратом при его использовании с модуляторами активности BCRP. Ингибирование BCRP этилметилгидроксипиридина сукцинатом может привести к увеличению концентрации в крови препаратов, являющихся субстратами данного транспортера, что следует учитывать в клинической практике для повышения эффективности и безопасности комбинированной фармакотерапии и профилактики нежелательных межлекарственных взаимодействий.

Разработанные высокочувствительные методики определения содержания метотрексата и митоксантрона с помощью ВЭЖХ-МС/МС могут быть использованы для изучения фармакокинетики и биоэквивалентности указанных препаратов и выполнения терапевтического лекарственного мониторинга.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанная методика позволяет на этапе доклинических исследований тестировать новые и известные лекарственные вещества, на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам BCRP и прогнозировать потенциал их фармакокинетических межлекарственных взаимодействий.

Полученные результаты, показавшие, что этилметилгидроксипиридина сукцинат не принадлежит к субстратам, но является ингибитором BCRP могут служить основой для оптимизации фармакотерапии и предотвращения нежелательных межлекарственных взаимодействий при использовании указанного препарата в комбинации с субстратами белка-транспортера.

Результаты по изучению влияния этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментах *in vitro* в дальнейшем следует подтвердить в

опытах *in vivo*, а также в клинических исследованиях, чтобы доказать значение для практики полученных результатов.

Разработанные и валидированные методики количественного определения метотрексата и митоксантрона могут быть использованы в других лабораториях фармакокинетики и в профильных клинических центрах при проведении терапевтического лекарственного мониторинга.

Полученные данные следует рекомендовать включить в соответствующие разделы Основной образовательной программы подготовки кадров высшей квалификации в ординатуре по специальности «Клиническая фармакология» медицинских образовательных учреждений.

Соответствие содержания диссертации автореферату и указанной специальности

Автореферат соответствует содержанию диссертационной работы, оформлен в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки России. Диссертация соответствует специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология.

Диссертация и автореферат хорошо иллюстрированы, материал изложен грамотным научным языком.

Публикации и апробация результатов исследования

По теме исследования опубликовано 9 работ – из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, входящих в международные базы WoS, Scopus и РИНЦ и 4 тезисов в материалах научных конференций.

Результаты исследования были представлены на научных конференциях различного уровня.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Принципиальных замечаний и недостатков в содержании и оформлении диссертации не выявлено, встречаются отдельные опечатки и пунктуационные ошибки, не влияющие на положительное восприятие материала.

В плане дискуссии возникают следующие вопросы:

1. Для каких субстратов BCRP могут оказаться нежелательными межлекарственные взаимодействия с этилметилгидроксипиридина сукцинатом?
2. Проверялась ли цитотоксичность субстратов BCRP при их использовании в максимальных дозах?
3. Почему при разработке методик количественного определения метотрексата, митоксантрона и кверцетина методом ВЭЖХ-МС/МС не использовали внутренний стандарт?

Заключение

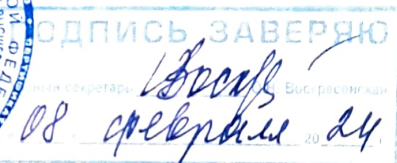
Диссертация Трановой Юлии «Разработка методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам белка-транспортера BCRP *in vitro*», на соискание ученой степени кандидата биологических наук является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи разработки и апробации методики тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам и модуляторам активности белка-транспортера BCRP, имеющей существенное значение для фармакологии, клинической фармакологии, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. - фармакология, клиническая фармакология.

Диссертация, автореферат и настоящий отзыв обсуждены и одобрены на открытом заседании кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) протокол № 6 от 8 февраля 2024 года.

Доктор медицинских наук, профессор,
Директор Института профессионального образования,
Заведующий кафедрой клинической фармакологии и
пропедевтики внутренних болезней
Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)



Ших Евгения Валерьевна



Подпись профессора Ших Е.В. заверяю:

Сведения о ведущей организации: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Сокращенное наименование:

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Адрес: 119991 г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

Тел. 8 (495) 609-14-00;

Электронная почта: rectorat@staff.sechenov.ru

Сайт: <https://www.sechenov.ru>