

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Пфаргер Ю.А. «Механизмы гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 14.03.03 – патологическая физиология.

Актуальность темы исследования. Актуальность диссертационного исследования не вызывает сомнений, поскольку в настоящее время дислипидемия является ключевым патогенетическим звеном целого ряда социально значимых заболеваний, к которым относятся ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2 типа, неалкогольная жировая болезнь печени. Своевременная коррекция дислипидемии – ключ к успешному лечению данных нозологий, улучшению исхода заболеваний. Существует большое количество лекарственных средств различных фармакологических групп для лечения дислипидемии. Это, прежде всего, статины (ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы), давно доказавшие свою клиническую эффективность; секвестранты желчных кислот; ингибиторы всасывания холестерина; ингибиторы пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексина типа 9 (PCSK9), нацеленные на протеин PCSK9, участвующий в контроле экспрессии рецепторов к ХС-ЛПНП; фибраты; никотиновая кислота, n-3 жирные кислоты; ингибиторы белка-переносчика эфиров холестерина. Хотя использование перечисленных препаратов в целом эффективно для коррекции дислипидемий, частота развития нежелательных явлений, таких как миопатия, функциональные нарушения печени, ЖКТ, поджелудочной железы, нефропатия, снижение нейрокогнитивных эффектов, канцерогенез так же высока. Поэтому в настоящее время ведется интенсивный поиск новых гиполипидемических лекарственных препаратов, обладающих высоким терапевтическим потенциалом с минимальным риском развития побочных реакций. Среди них особый интерес представляют сесквитерпеновые лактоны, характеризующиеся широким спектром фармакологической активности, включая гиполипидемические эффекты. В этой связи, диссертационная работа Пфаргер Юлии Андреевны посвященная установлению основных молекулярных звеньев патогенеза гиперлипидемии, а также выявлению патогенетически обоснованных мишеней действия сесквитерпенового лактона ахиллина представляется весьма актуальной и оправданной как с точки зрения фундаментальной науки, так и как возможный путь оптимизации гиполипидемической терапии.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые проведен комплексный анализ гиполипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина на экспериментальных моделях гиперлипидемии *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что одним из гиполипидемических эффектов ахилина является модуляция активности экспрессии мРНК генов липидного обмена в печени. Показано, что мишенями гиполипидемического эффекта сесквитерпенового лактона ахилина являются гены ферментов липидного обмена (ГМГ-КоА-редуктаза (*Hmgcr*), карнитин-

пальмитоилтрансфераза 1 (Cpt1a) и 2 (Cpt2), 7 α -гидроксилаза (Cyp7a1), ацилКоА: холестеролацилтрансфераза (Soat1) и ацетил-КоА-карбоксилаза (Acaca)) и ген рецептора к липопротеинам низкой плотности (Ldlr). Впервые показано, что в условиях экспериментальной гиперлипидемии ахиллин обладает антиоксидантной активностью, обусловленной повышением уровня восстановленного глутатиона в клеточной культуре линии НТС.

Результаты, представленные в экспериментальных исследованиях Пфаргер Юлии Андреевны расширяют научную базу для понимания молекулярных эффектов сесквитерпенового лактона ахиллина, определяют целесообразность проведения дальнейших доклинических исследований и обосновывают перспективность разработки гиполипидемических средства на основе ахиллина.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 11 таблицами. Библиографический указатель включает 262 источника (63 - отечественных и 199 - иностранных).

Во введении автор обосновывает актуальность заявленной темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, представляет основные положения, выносимые на защиту; приводит факты, подтверждающие научную новизну работы, ее практическую значимость, характеризует апробацию результатов и степень их внедрения, кратко характеризует методологию исследования.

Цель научного исследования сформулирована четко и заключается в патогенетическом обосновании использования сесквитерпенового лактона ахиллина при экспериментальной гиперлипидемии и установлении молекулярных механизмов его гиполипидемического действия.

Обзор литературы в полном объеме отражает суть диссертационной работы. Автор дает исчерпывающее представление о современном состоянии проблемы, важные разделы посвящены рассмотрению ключевых положений липидного метаболизма, включая гомеостаз холестерина, жирных кислот и их регуляцию в физиологических условиях. Автор охарактеризовала экспериментальные модели гиперлипидемий, очень подробно изложены характеристики гиперлипидемии, вызванной липофундином и несколько меньше внимания уделяется остальным, использованным в работе экспериментальным гиперлипидемиям, индуцированным этанолом, тритоном и высокожировой диетой. Сделан акцент на патогенетическом обосновании основных мишеней и принципов гиполипидемического действия лекарственных средств, а также описаны сесквитерпеновые лактоны, как перспективные соединения для профилактики и лечения гиперлипидемии. Информационный материал снабжен 8 рисунками и 2 таблицами, поясняющими суть рассматриваемых вопросов. В качестве пожелания хотелось бы видеть в конце обзора литературы заключение, в котором указаны приоритетные направления проблемы, требующие своевременного решения, в том числе в данной работе.

В главе 2 представлен широкий спектр современных методических приемов, которыми овладела Пфаргер Ю.А. (культивирование клеток, моделирование гиперлипидемии *in vitro* и *in vivo*, иммунофлюоресцентный анализ, количественная ПЦР для определения РНК, анализ профиля экспрессии генов и т.д.) и приведено подробное их описание. Однако следует заметить, что этому разделу работы не хватает схемы дизайна исследования, в которой автор объединила бы все направления (модели гиперлипидемии на клетках НТС + модели на животных + препараты), что существенно облегчило бы восприятие работы, ведь она такая многоплановая!!

Глава 3 включает 6 разделов и дает полное представление о большом объеме работы, проделанной Пфаргер Ю.А.

С учетом многоплановости исследования, позволю себе разделить эту главу на два основных направления – экспериментальные исследования на клетках гепатомы линии НТС и экспериментальные исследования на животных.

1-ое направление – оценка действия ахилина в условиях экспериментальной гиперлипидемии, индуцированной липофундином в клетках гепатомы линии НТС. В ходе выполнения этого раздела работы, автором определены концентрации ахилина (0,5-1,5 мМ), которые не снижают жизнеспособности клеток гепатомы и обладают гиполипидемическим действием. Получен интересный факт снижения уровня ТАГ в клеточной культуре гепатомы линии НТС под действием ахилина, однако, менее выраженный, чем у препарата сравнения гемфиброзила. В тоже время, в отличие от гемфиброзила, ахилин снижал содержание ХС.

Вопросы для дискуссии:

- С чем связана более высокая концентрация ТАГ в клеточной культуре гепатомы линии НТС при концентрации липофундина 0,05% по сравнению с 0,1%?
- Почему в качестве препарата сравнения в данных экспериментах выбран фибрат гемфиброзил, а не препарат, относящийся к группе ингибиторов ГМГ-коэнзимА-редуктазы, ведь ахилин и статины имеют схожее строение и как показали результаты работы схожие эффекты (снижение концентрации ХС)?

Следующим этапом работы было исследование влияния сесквитерпенового лактона ахилина на величину экспрессии мРНК ключевых генов метаболизма липидов при экспериментальной гиперлипидемии в клеточной культуре гепатомы линии НТС. Установлено, что сесквитерпеновый лактон ахилин не оказывает существенного влияния на величину экспрессии мРНК гена *Ldlr* в клеточной культуре гепатомы линии НТС. В тоже время, препарат сравнения гемфиброзил, напротив, увеличивает экспрессию мРНК гена рецептора к ЛПНП (*Ldlr*), что, по мнению автора, может быть обусловлено активацией транскрипционных факторов SREBP и PPAR- α .

Вопрос для дискуссии:

- Почему гемфиброзил с учетом его положительного влияния на экспрессии мРНК гена *Ldlr* в клеточной культуре гепатомы линии НТС не снижал концентрацию ХС в клеточной культуре?

Автор так же изучила влияние ахилина на величину экспрессии мРНК гена фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (*Hmgcr*) в клеточной культуре линии НТС и обнаружила, что ахилин увеличивал экспрессию гена *Hmgcr*, а гемфиброзил не оказывал существенного влияния на экспрессию гена *Hmgcr* по сравнению с контролем.

Вопрос для дискуссии

- Не было бы более логичным использовать в этой серии экспериментов в качестве группы сравнения ингибиторы фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы?
- Как все же объяснить снижение концентрации ХС в гепатоме на фоне активации экспрессии гена ГМГ-КоА-редуктазы, что же является первопричиной снижения уровня ХС?

В следующей серии экспериментов установлены разнонаправленные эффекты ахилина относительно ключевых генов липидного метаболизма, так ахилин ингибировал экспрессию мРНК гена фермента ацетилКоА: холестеролацилтрансферазы (*Soat1*), в то же время повышал экспрессию мРНК гена *Cyp7a1* и генов *Cpt1a* и *Cpt2*. Завершающим этапом серии экспериментов на клеточной культуре НТС была оценка антиоксидантной активности ахилина. Автор убедительно показала, что ахилин препятствует развитию окислительного стресса в клеточной культуре линии НТС, оказывая не прямое антиоксидантное действие за счет повышения содержания восстановленного глутатиона. Следует отметить, что автор получила много интересных результатов, касающегося действия липофундина, что может так же представлять определенный интерес для клиницистов, ведь этот препарат широко применяют в клинике.

2-ое направление – экспериментальные модели гиперлипидемий на животных и их коррекция с помощью ахилина:

Установлено, что курсовое ведение ахилина крысам с острой гиперлипидемией, индуцированной этиловым спиртом, вызывало снижение уровня ТАГ, ХС и СЖК, подобный эффект оказывал и препарат сравнения никотиновая кислота.

Вопрос для дискуссии:

- Почему никотиновая кислота использована как препарат сравнения, ведь ее применение в клинике в качестве гиполипидемического препарата очень ограничено?

На модели острой гиперлипидемии, индуцированной тритоном WR 1339, ахилин демонстрировал очень схожие эффекты, описанные ранее, однако, в качестве контрольного препарата был выбран фенофибрат.

Вопрос для дискуссии:

- Зачем была выбрана вторая модель острой гиперлипидемии и почему фенофибрат был препаратом сравнения, а не никотиновая кислота как в первом случае?

Автором показано, что сесквитерпеновый лактон ахиллин как и в острой ситуации, на модели хронической гиперлипидемии проявил гипополипидемическую активность, обусловленную нормализацией уровня ТАГ, ХС, СЖК, ХС-ЛПНП в сыворотке крови экспериментальных крыс, а также снижением содержания ТАГ и ХС в печени крыс. Снижение содержания ТАГ и ХС в печени и сыворотке крови при курсовом введении ахиллина было обусловлено увеличением экспрессии генов карнитин-пальмитоилтрансферазы 1 и 2 (Cpt1a и Cpt2), 7 α -гидроксилазы (Cyp7a1) и ингибированием экспрессии гена АХАТ (Soat1). Следует отметить, что полученные результаты обсуждены с привлечением имеющихся в научной литературе данных последних лет, что подтверждает их обоснованность и новизну; материал достаточно полно иллюстрирован в таблицах и рисунках.

Вопрос для дискуссии:

- Чем обусловлен такой разброс в выборе препаратов сравнения (гемфиброзил, фенофибрат, розувастатин, никотиновая кислота)?
- Чем обусловлены сроки наблюдения 7 и 14 дней?

В разделе **Заключение** автор обобщает полученные данные и приводит собственную схему, отражающую механизмы гипополипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина, в том числе с привлечением собственных результатов.

Выводы закономерно вытекают из результатов собственных исследований и полностью соответствуют цели и задачам, поставленным в работе.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и сформулированных выводов

Достоверность научных результатов обусловлена высоким методическим уровнем работы, достаточным объемом экспериментального материала, адекватной статистической обработкой полученных результатов.

Результаты диссертационной работы широко апробированы на научно-практических конференциях различного уровня и опубликованы в журналах, рекомендуемых ВАК (8 статей).

Автореферат соответствует содержанию диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по работе нет.

Заключение

Диссертационная работа Пфаргер Юлии Андреевны «Механизмы гипополипидемического действия сесквитерпенового лактона ахиллина», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 14.03.03 – патологическая физиология является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи по определению основных звеньев патогенеза гиперлипидемии и скрининга новых молекул с потенциальным гипополипидемическим действием, что имеет важное значение для фармакологии, клинической фармакологии, патологической физиологии и медицинской науки в целом.

По актуальности и уровню проведенных исследований, а также значению полученных результатов диссертационная работа Пфаргер Юлии Андреевны полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автор Пфаргер Ю.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология и 14.03.03 – патологическая физиология.

Заведующая лабораторией
исследования гемостаза
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний»
доктор медицинских наук



О. В. Груздева

Контакты:
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6;
+7-(3842) 64-05-53
gruzov@kemcardio.ru

Подпись Груздевой О. В. заверяю:
Ученый секретарь НИИ КПССЗ,
кандидат медицинских наук



Я. В. Казачек

30 октября 2017 г.