

ОТЗЫВ

официального оппонента проф. Резникова К.М. о диссертации Муравьевой Варвары Юрьевны «Церебропротекторные свойства новых производных циклических гуанидинов ингибиторов Na^+/H^+ обмена», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук в диссертационный совет Д.208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете по специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология

Актуальность

Современная методология создания эффективных и безопасных лекарственных средств ориентирована не только на поиск оригинальных молекул не чужеродных для организма, но и на установление новых точек взаимодействия этих молекул с элементами живого организма. Несмотря на отрицание Г. Линга (2008) наличия каких либо каналов в живых клетках, появляются веские доказательства обратного. В частности, доказанной является роль Na^+/H^+ обменника в формировании ишемических повреждений мозга. С этих позиций диссертационная работа Муравьевой Варвары Юрьевны, посвященная проблеме поиска и изучения ингибиторов Na^+/H^+ обменника среди производных циклических гуанидинов, как нового класса соединений с нейропротекторной активностью, является весьма актуальной. Если удастся доказать, что биологически активное соединение высокоэффективно и безопасно, то арсенал корректоров изменений метаболических процессов на ранних стадиях ишемического инсульта пополнится препаратом, включающимся в самые тонкие восстановительные реакции формирования ишемического инсульта.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования, прежде всего, заключается в выявлении наиболее биологически активных соединений, относящихся к классу новых производных циклических гуанидинов способных корригировать обмен протонов и ионов натрия. Это доказано исследованиями *in vitro*, *in silico*, что позволило впервые установить закономерности между выраженной NHE-1-ингибирующей активностью изучаемых соединений и их физико-химическими свойствами, и на основании методов *in vivo* изучить нейропротекторные свойства соединения-лидера.

В работе установлен ранее неизвестный научный факт, заключающийся в том, что при изучении NHE-1–ингибирующей активности новых производных, содержащих гуанидиновую группу они содержат частично встроенную (производные 2–аминобензимидазола) и полностью встроенную в цикл (производные N⁹-замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазола). Важным для понимания механизмов формирования позитивного эффекта при патологии мозга является впервые установленное свойство этих соединений, что выраженность NHE-1 ингибирующей активности производных 2–аминобензимидазола определяется электронными параметрами, центрированными на гуанидиновый фрагмент.

Впервые автором работы на модели эндоваскулярной окклюзии левой средней мозговой артерии с последующей реперфузией доказано, что соединение РУ-1355 при однократном и курсовом введении проявляет нейропротекторное действие, предположительно связанное с ингибированием NHE-1 и снижением кальциевой перегрузки клетки. Кроме того показано, что в условиях глобальной ишемии/реперфузии головного мозга наиболее активное соединение оказало позитивное гемореологическое действие.

Научно-практическая значимость исследования

Важным для науки является ряд установленных в исследованиях *in silico* новых явлений по закономерности между высоким уровнем NHE-1–ингибирующей активности новых производных циклических гуанидинов и электронными параметрами, центрированными на гуанидиновый фрагмент, что может быть использовано для направленного синтеза и поиска новых соединений с высокой активностью. Сформированная база этих соединений по данному виду активности, также может использоваться для дальнейшего анализа зависимости активности веществ от их химической структуры.

Результаты исследования РУ-1355 на экспериментальной модели ишемии мозга, свидетельствуют о наличии выраженного противоишемического действия при повреждении головного мозга, а также о коррекции тромбогенных и гемореологических нарушений, при этой патологии, что свидетельствует о необходимости проведения расширенных доклинических исследований.

Полученные результаты автором диссертационного исследования рекомендуется также использовать в некоторых разделах учебного процесса кафедр фармакологии особенно в разделе общей фармакологии по созданию новых лекарственных средств, оказывающих позитивное влияние на центральную нервную систему.

Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертационной работы

Для достижения цели и решения поставленных задач в диссертационной работе, автором использован комплекс современных высокоинформативных методик с использованием достаточного количества 3-х видов лабораторных животных, препаратов сравнения, сертифицированных приборов и устройств, позволивших получить объективные данные, начиная от скрининга и заканчивая исследованиями на целом животном. В ходе работы были соблюдены этические принципы и необходимые требования к проведению исследования противоишемического (нейропротекторного) и гемореологического действия соединения РУ-1355. Диссертантом представлены материалы в таблицах, графиках и рисунках, на основании которых был проведён тщательный анализ результатов и сформулированы основные положения научной работы. Грамотная статистическая обработка полученных автором данных с использованием параметрических и непараметрических критериев, позволила подтвердить высокую достоверность установленных явлений.

Общая оценка содержания и оформления диссертации

Текст диссертации изложен на 204 страницах машинописного текста, и иллюстрирован 41 таблицами, 16 рисунками, включает введение, обзор литературы (глава I), материалы и методы (глава II), изложение и анализ результатов экспериментов (главы III-VII), обсуждение полученных данных (глава VIII), выводы. Список литературы представляют 76 отечественных и 104 иностранных источника.

Во введении автор обстоятельно аргументирует актуальность, новизну и научно-практическую значимость исследования, представляет положения, выносимые на защиту; чётко формулирует цель и задачи диссертационной работы.

В обзоре литературы диссертант демонстрирует хорошие знания исследуемой проблемы и излагает современные представления о возможностях и необходимости целенаправленного поиска средств, оказывающих тормозное действие на натрий-протонную систему. При анализе литературы автором были использованы публикации зарубежных и отечественных ученых за последние 10 лет. В данной главе представлены достаточно полные эпидемиологические данные по ишемическому инсульту, а также приведена современная классификация нейропротекторов, которые применяются в клинической практике. Положительным является подробное изложение современных представлений об ингибиторах Na^+/H^+ обменника и участии его в патологиях ЦНС, детально рассмотрен класс производных циклических гуанидинов, имеющих широкий спектр биологической активности и на основании данных литературы обоснован поиск среди данного класса веществ, препаратов, ингибирующих NHE-1.

Во 2-й главе автором подробно описаны современные методы экспериментальных исследований. На первом этапе автором работы проведено изучение NHE-1 ингибирующей активности двух химических классов производных N^9 -имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и 2-аминобензимидазола на тромбоцитах кролика по методу D. Rosskopf et al. [1991] и K. Kusumoto [2002]. Далее описаны методики исследований *in silico* пошаговым дискриминантным анализом для оценки зависимости степени NHE-1 ингибирующей активности производных циклических гуанидинов от их физико-химических свойств, на основании расчета и сравнения, центрированных на гуанидиновый фрагмент электронных параметров для соединений с частично и полностью встроенной в цикл гуанидиновой группой. Изучение нейропротекторных свойств проводилось на модели эндоваскулярной окклюзии левой средней мозговой артерии по признанной методике [Koizumi, 1986] в модификации [Longa, 1989] и [Belayev, 1997]. Материалы этой главы дают полное представление о путях реализации поставленных задач, решение которых дало возможность достигнуть поставленную цель.

В 3-й главе приведены убедительные данные *in vitro* о влиянии новых производных циклических гуанидинов на процессы светопропускания плазмы

богатой тромбоцитами, а также материалы *in silico* результаты зависимости их NHE-1–ингибирующей активности от химической структуры. Была выявлена высокая NHE-1-ингибирующая для производных 2–аминобензимидазола, которая определялась электронными параметрами, центрированными на гуанидиновый фрагмент. И на основании данных анализа результатов *in vitro* было выбрано соединение РУ-1355 превосходившее препарат сравнения зонипорид и изученные соединения по величине IC₅₀.

Подробная информация о нейропротекторном (противоишемическом) действии соединения РУ-1355 - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид на модели фокальной ишемии/реперфузии головного мозга при однократном и курсовом введении в дозе 1,12 мг/кг представлена в 4-й главе. Позитивный эффект исследуемого соединения РУ-1355 был подтвержден ограничением уровня концентрации нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, уменьшением выраженности отека и размеров некроза головного мозга, а так же улучшением неврологических и поведенческих показателей.

Пятая глава посвящена изложению результатов по изучению влияния соединения РУ-1355 на тромбогенный потенциал и вязкость крови. В условиях экспериментальной ишемии/реперфузии соединение РУ-1355 способствовало уменьшению вероятности тромбогенных осложнений за счет ограничения активации и агрегации тромбоцитов, эритроцитов и нормализации вязкостных свойств крови. В условиях артериального тромбоза исследуемое соединение пролонгировало время образования тромба.

Данные о взаимодействии соединения РУ-1355 с различными нейромедиаторными системами представлены в шестой главе. Показано, что в эффективной дозе 1,12 мг/кг это соединение существенного влияния на эффекты нейромедиаторных модуляторов ЦНС не оказывало. Увеличение дозы до 5,0 мг/кг привело лишь к незначительному влиянию на некоторые нейромедиаторные системы.

В 7 главе описано изучение общепармакологических свойств соединения РУ-1355. Показано, что исследуемое соединение в дозе 1,12 мг/кг и 5,0 мг/кг не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную

возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений вегетативной нервной системы. Однако в более высоких дозах (25, 125 и 250 мг/кг), было выявлено постепенное нарастание неблагоприятных эффектов, что проявилось в нарушении двигательной, мышечной координации, поведенческих реакций, изменением состояния вегетативной нервной системы, рефлексов, а при введении максимально изучаемых доз наблюдали гибель животных.

В последней главе автор проводит детальное обсуждение полученных результатов с учетом обзора современной литературы. Все основные положения достаточно обоснованы и аргументированы. Логика представления материала, хорошее иллюстративное сопровождение полученных данных, обстоятельное резюме в конце каждой главы дают возможность полностью ознакомиться со всеми материалами исследования и сделать вывод о том, что автор работы может самостоятельно решать конкретные научные задачи в области поиска новых эффективных и безопасных соединений для создания препаратов для лечения неврологических больных..

Изложение материала завершается представлением выводов, соответствующих поставленным задачам и полностью обоснованными количественными характеристиками собственных исследований. Прослеживается соответствие цели, положений, выносимых на защиту, и выводов диссертации, что подтверждает достижение цели научной работы, которую можно считать полностью завершённой.

Автореферат оформлен в соответствии с существующими требованиями и отражает все основные положения диссертации. Большое количество публикаций и выступлений на научных форумах различного уровня свидетельствуют о том, что с её материалами знаком значительный круг специалистов

По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ, в том числе 3 работы в журналах, рекомендуемых ВАК и 3 патента.

Принципиальных замечаний по работе нет. Однако при ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Каковы перспективы дальнейшего исследования соединения под шифром РУ-1355?

2. При оценке двигательной активности в тесте «отрытое поля» Вы использовали такой параметр как прекращение «сидения на месте», насколько целесообразен Ваш выбор, предполагая, что данный параметр эквивалентен другому показателю – «движения на месте»?

Заключение

Диссертационная работа Муравьевой Варвары Юрьевны «Церебропротекторные свойства новых производных циклических гуанидинов ингибиторов Na^+/H^+ обмена», выполненная под руководством академика РАН, проф. А.А.Спасова и представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук в диссертационный совет Д.208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете, является законченным самостоятельно выполненным, научным трудом, в котором содержатся сведения, совокупность которых можно считать решением актуальной научной задачи: поиск эффективных и безопасных ингибиторов Na^+/H^+ обменника, имеющей важное значение для развития соответствующих разделов фармакологии и неврологии. По актуальности, методическому уровню выполнения, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация Муравьевой Варвары Юрьевны «Церебропротекторные свойства новых производных циклических гуанидинов ингибиторов Na^+/H^+ обмена» полностью соответствует критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., №842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.06 фармакология, клиническая фармакология, а диссертант заслуживает присвоения искомой степени.

Официальный оппонент:

заслуженный деятель науки РФ,
д.м.н., профессор кафедры фармакологии ВГМУ
имени Н.Н. Бурденко

К.М. Резников

394005 г. Воронеж, ул. Студенческая, 10

Тел.: (473) 253-10-65

VRKMF@yandex.ru

Подпись проф. К.М. Резникова удостоверяю:

Начальник УК ВГМУ

С.И. Скорынин

Список опубликованных работ, близких тематике диссертационного исследования

1. Борисова Е.А., Резников К.М., Агасаров Л.Г. Оценка эффективности лечения больных ишемическим инсультом в раннем восстановительном периоде. // Вестник восстановительной медицины. 2015. №1. . 19-28.

2. Лаптева В.И., Резников К.М., Борисова Е.А., Брездынук А.Д., Трофимова Т.Г. Оценка действия жидкостей с измененным окислительно-восстановительным потенциалом в эксперименте // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2013. № 1. С. 223.
3. Резников К.М., Борисова Е.А. Концепция генерализованной рецепторно-информационной системы организма // Традиционная медицина. 2012. № 29 (31). С. 52-55.
4. Борисова Е.А., Резников К.М., Лаптева В.И. Способ оценки эффективности лечения больных ишемическим инсультом // IV съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» 2012.- Казань.- С.24.
5. Борисова Е.А., Резников К.М. Оптимизация лечения больных ишемическим инсультом // Вестник новых медицинских технологий. – Тула. – 2011. Т.ХVIII, №2. – С. 73-75.