

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, профессора, заведующего кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Калениковой Елены Игоревны на диссертацию Хусаиновой Гульнары Хамзаевны на тему «Производные нейроактивных аминокислот как регуляторы функционального состояния митохондрий возбудимых тканей крыс в норме и при экспериментальных патологиях», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук в Диссертационный совет 21.2.005.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по специальности 3.3.6.- Фармакология, клиническая фармакология.

Актуальность темы исследования

Митохондрии представляют собой внутриклеточные органеллы эукариотических клеток, которые участвуют в биоэнергетическом метаболизме и клеточном гомеостазе, включая генерацию аденозинтрифосфата (АТФ) посредством транспорта электронов и окислительного фосфорилирования в сочетании с окислением метаболитов циклом трикарбоновых кислот и катаболизмом жирных кислот с помощью β -окисления. Митохондрии производят активные формы кислорода, инициируют и реализуют апоптоз, активируют многочисленные пути передачи сигналов, связанные со смертью клеток, регулируя транслокацию проапоптотических белков из промежуточного пространства митохондрий в цитозоль. Этим обусловлено появление новой дисциплины — медицины митохондрий и начало развития митохондриальной фармакологии с использованием митохондрий как мишеней для различного рода воздействий, что может служить биохимической основой при разработке новых лекарственных средств. Комбинированное использование модуляторов метаболизма митохондрий и средств классической терапии может послужить существенному повышению эффективности лечения множества заболеваний.

Рецензируемая диссертационная работа посвящена изучению влияния производных гамма-аминомасляной кислоты и глутаминовой кислоты на показатели функциональной активности и антиоксидантный статус митохондрий клеток головного мозга и сердца животных при алкогольной интоксикации и остром стрессе.

По данным ВОЗ, сердечно-сосудистые и цереброваскулярные патологии являются основными причинами смертности в мире.

Известно, что злоупотребление алкоголем в высоких дозах усиливает процесс атеросклероза с поражением коронарных, церебральных и периферических сосудов, увеличивает артериальную гипертензию, вызывает прогрессирующее повреждение миокарда, аритмию, а также может вызывать интоксикацию в центральной нервной системе. Другим фактором развития сердечно-сосудистых и нейродегенеративных патологий является чрезмерное и длительное воздействие стрессирующих факторов.

Исследования многих зарубежных и Российских ученых показывают, что развитие патологий сердца и мозга при алкогольной интоксикации и стрессе связаны с митохондриальной дисфункцией, приводящей к дефициту энергии в клетках.

Под действием стрессорного фактора в организме повышается активность липаз, фосфолипаз, что ведет к развитию окислительного стресса в митохондриях, усилению процессов перекисного окисления липидов, повреждению липидсодержащих компонентов митохондриальных мембран, нарушению трансмембранных и внутриклеточных процессов и программируемой гибели клеток.

Поэтому, поиск веществ, способных ограничивать повреждающее действие стресса и снижать негативные последствия алкогольной интоксикации, выявление механизмов их протективного эффекта является актуальным и перспективным направлением фармакологии, поскольку позволяет конкретизировать терапевтические мишени при социально значимых заболеваниях.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Диссертантом впервые проведен комплексный анализ влияния 6-ти производных гамма-аминомасляной кислоты и 2-х производных глутаминовой кислоты на показатели функциональной активности и антиоксидантный статус митохондрий клеток головного мозга и сердца крыс в условиях острого иммобилизационно-болевого стресса и алкогольной интоксикации. Среди рассматриваемых соединений выявлены два вещества (салифен и фенотропил), которые в большей степени улучшали функциональное состояние митохондрий печени в условиях окислительного стресса, вызванного трет-бутилгидропероксидом. Установлена зависимость эффекта *in vitro* от концентрации салифена и фенотропила. Выявлено защитное действие исследуемых веществ на митохондрии мозга и сердца животных в условиях острого стресса и алкогольной

интоксикации. Полученные данные обладают несомненной научной новизной и имеют важное теоретическое и практическое значение.

Структура и оформление диссертации. Диссертационная работа Хусаиновой Гульнары Хамзаевны изложена на 181 странице печатного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных данных, выводы и практические рекомендации. Работа иллюстрирована 58 рисунками и 17 таблицами. Литературный указатель содержит 50 отечественных и 190 зарубежных источников.

Во введении представлены актуальность, степень разработанности проблемы, цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, личный вклад, степень достоверности и апробация результатов.

Обзор литературы представляет логично структурированный анализ актуальных данных 240 источников, 70% из которых – материалы, опубликованные за последние 10 лет. В нем подробно представлена роль митохондрий в патогенезе различных заболеваний с акцентом на механизмы повреждения клеточных структур под влиянием стресса и алкогольной интоксикации, приводятся способы предотвращения и ограничения повреждения митохондрий.

Во второй главе «Материалы и методы» содержится подробное описание использованных подходов, материалов и методов исследования. Эксперименты были проведены на 204 крысах Wistar (самцы и самки) массой 230-350 г. На первом этапе исследования среди производных ГАМК и ГК автором был проведен скрининг веществ, оказывающих наиболее выраженное положительное влияние на скорость дыхания поврежденных и интактных митохондрий в условиях *in vitro*. Выделение митохондрий проводилось методом дифференциального центрифугирования. Скрининг был проведен на митохондриях печени 16 крыс; суспензию митохондрий от каждого животного делили на несколько аликвот и инкубировали с исследуемыми веществами. Повреждение митохондрий *in vitro* осуществлялось путем инкубирования суспензии митохондрий с сильным окислителем – трет-бутилгидропероксидом. На этом этапе выявлялась наиболее эффективная концентрация препаратов-лидеров. Для оценки защитного действия изучаемых соединений на поврежденные митохондрии *ex vivo* автор моделировал

иммобилизационный стресс путем подвешивания крыс за дорсальную шейную складку на 24 часа и алкогольную интоксикацию как результат перорального введения животным раствора этанола. Функциональную активность митохондрий изучали полярографическим методом по скорости поглощения кислорода в различных метаболических состояниях с помощью электрода Кларка. В гомогенатах сердца и головного мозга диссертант определял активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), сукцинатдегидрогеназы и концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида).

В целом, в работе использованы адекватные поставленным задачам методы, выполненные на современном высокотехнологичном оборудовании.

В третьей главе представлены результаты экспериментальных исследований соискателя. Выявлены соединения-лидеры салифен и фенотропил, оказывающие *in vitro* наиболее выраженное положительное действие на митохондрии клеток печени в условиях окислительного повреждения трет-бутилгидропероксидом. Трет-бутилгидропероксид вызывал разобщение окислительного фосфорилирования, что выражалось в снижении скорости АДФ-индуцированного дыхания и повышении потребления кислорода после истощения АДФ. Установлено, что в диапазоне концентраций 1×10^{-7} М - 1×10^{-5} М оба соединения повышали значения дыхательного контроля. Максимальный эффект в отношении показателей скорости потребления кислорода V3 для соединений-лидеров обеспечивала максимальная из испытанных концентрация - 1×10^{-5} М.

В экспериментах *ex vivo* в митохондриях тканей как от алкоголизованных крыс, так и от животных с постстрессорными нарушениями салифен в дозе 15 мг/кг и фенотропил в дозе 25 мг/кг повышали средние значения скорости потребления кислорода в комплексах дыхательной цепи в состоянии V3 по Чансу при относительно низких значениях показателя V4 по Чансу, что приводило к повышению коэффициента дыхательного контроля в митохондриях клеток головного мозга и сердца. Установлено, что концентрация антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза) под действием салифена и фенотропила повышается, а уровень продуктов ПОЛ снижается по сравнению с показателями контрольной группы. Это может свидетельствовать об ограничении окислительного повреждения митохондрий в условиях острого стресса и алкогольной интоксикации.

Диссертация завершается обсуждением полученных результатов, выводами и научно-практическими рекомендациями.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, рекомендаций и выводов

Достоверность научных результатов подтверждена достаточным объемом экспериментальных исследований с использованием современного сертифицированного оборудования для сбора и обработки данных (центрифуга «К-23» (Германия), полярограф Oxytherm system («Hansatech Inst», Англия), спектрофотометр Helios (Великобритания)), сопоставимостью теоретических и экспериментальных результатов исследования, полученных при непосредственном участии соискателя.

Выводы и научно-практические рекомендации подтверждены полученными результатами и согласуются с целями и задачами исследования.

Материалы диссертации опубликованы в 14-ти печатных работах, в том числе в 6-ти статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на различных научных конференциях.

Автореферат отражает краткое содержание диссертации и оформлен в соответствии с современными требованиями.

Замечания:

1. В тексте диссертации присутствует значительное количество орфографических, синтаксических ошибок, несогласованности окончаний и других помарок (например, «...ГАМК и его производные...»). В автореферате в табл. 7 ошибочно дублируются одни и те же столбики значений МДА для животных с хронической алкогольной интоксикацией и стрессированных животных.
2. Общеизвестно явление контракции при смешивании этилового спирта с водой. В описании приготовления 10% раствора этанола для моделирования хронической алкогольной интоксикации животных контракция не была учтена. Конечно, при приготовлении растворов с содержанием спирта менее 30% это явление крайне незначительно (в доступных таблицах разведений это минимальная концентрация). Но приведенная в тексте формула разведения, не учитывающая контракцию, без оговорок

предлагается как универсальная формула для разведений этанола до любой концентрации!

3. В параграфе 2.2 главы «Материалы и методы» очевидна путаница в наименовании экспериментальных групп и подгрупп. Так, фракции митохондрий из печени одного животного подразделены на 2 группы – «интактные» и «поврежденные» окислителем. При этом «интактные» неправомерно включают также подгруппы с внесением препаратов (наличие эффектов которых представлено на стр. 64), а группа под названием «поврежденные» включает подгруппу действительно интактных – инкубированных в физиологическом растворе.

При ознакомлении с диссертацией также возникли следующие вопросы:

1. Какова в Вашем исследовании роль препаратов сравнения кверцетина и милдроната, если никакого сравнения по эффективности с ними в обсуждении не представлено?
2. Можно ли называть кверцетин препаратом, если на его основе только БАДы?
3. Почему в исследованиях на гомогенатах печени веществом сравнения выбран кверцетин, а экспериментах *ex vivo* – милдронат? (В обзоре литературы автор приводит данные о нейропротекторном действии кверцетина *in vivo*!)
4. На модели хронической алкогольной интоксикации салифен и фенотропил значимо не влияли на уровень СОД, каталазы в гомогенатах мозга и сердца, глутатионпероксидазы в гомогенатах сердца, причем салифен не менял уровень перечисленных ферментов нигде, кроме мозга, а фенотропил сохранял только тканевой уровень сукцинатдегидрогеназы. Аналогично, на модели иммобилизационного стресса влияние фенотропила и салифена на уровни ГП и СДГ в мозге, каталазы в сердце статистически не значимо (стр. 134-136 диссертации, табл. 13,14; табл. 9 и текст на стр. 20 автореферата).

Между тем, выводы сделаны обратные – о наличии эффекта. Как Вы объясните это противоречие?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Хусаиновой Гульнары Хамзаевны на тему «Производные нейроактивных аминокислот как регуляторы функционального состояния митохондрий возбудимых тканей крыс в норме и при экспериментальных патологиях», представленная

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.3.6. - Фармакология, клиническая фармакология, является завершенной научной квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи в области экспериментальной и клинической фармакологии, состоящей в углубленном фармакологическом анализе влияния производных ГАМК на показатели функциональной активности и антиоксидантный статус митохондрий крыс в норме и при экспериментальных патологиях, что имеет существенное значение для фармакологии.

Работа полностью соответствует паспорту специальности 3.3.6 – фармакология, клиническая фармакология. Актуальность темы, новизна, научно-практическая ценность и объем выполненных работ полностью соответствует требованиям, предъявляемым действующим «Положением о порядке присуждения ученых степеней» (утвержденным Постановлением Правительства РФ 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней») к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Хусаинова Г.Х. заслуживает присвоения ученой степени кандидата фармацевтических наук.

Официальный оппонент
заведующий кафедрой фармацевтической химии,
фармакогнозии и организации фармацевтического дела
факультета фундаментальной медицины,
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»
доктор фармацевтических наук, профессор



Каленикова Елена Игоревна

«24» октября 2022г.

Подпись Калениковой Елены Игоревны
Подтверждаю

Декан факультета фундаментальной медицины, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
академик РАН



Ткачук Всеволод Арсеньевич

«24» октября 2022г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1

Тел: +7(495)939-10-00, E-mail: infoi@rector.msu.ru

www.msu.ru

СОГЛАСИЕ ОППОНЕНТА

Я, Каленикова Елена Игоревна, доктор фармацевтических наук по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФФМ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», даю свое согласие выступить в качестве официального оппонента по диссертации Хусаиновой Гульнары Хамзаевны «Производные нейроактивных аминокислот как регуляторы функционального состояния митохондрий возбудимых тканей крыс в норме и при экспериментальных патологиях», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология.

Членом экспертного совета ВАК не являюсь

О месте и дате защиты информирован.

«29» августа 2022 г.



ПОДПИСЬ

Подпись доктора фармацевтических наук, профессора Е.И. Калениковой подтверждаю

Декан

Факультета фундаментальной медицины

ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова

Академик РАН



В.А. Ткачук

ФФМ ФГБОУ ВО МГУ
имени М.В. Ломоносова
тел.: (495)932 88 14
тел./факс: (499) 726 55 47
ekaleni@fbm.msu.ru
ekaleni@yandex.ru

**Сведения об официальном оппоненте по диссертации Хусаиновой
Гульнары Хамзаевны «производные нейроактивных аминокислот как
регуляторы функционального состояния митохондрий возбудимых
тканей крыс в норме и при экспериментальных патологиях»,
представленной на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.3.6 – Фармакология,
клиническая фармакология.**

Ф.И.О. оппонента	Каленикова Елена Игоревна
Ученая степень	доктор фармацевтических наук
Шифр и наименования специальностей, по которым защищена диссертация	14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология.
Ученое звание	профессор
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Занимаемая должность	заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела Факультета фундаментальной медицины
Почтовый индекс и адрес	119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, д.27, корп.1
Телефон	8(495)932-88-14 тел./факс: (499) 726-55-47
Адрес электронной почты	ekaleni@fbm.msu.ru
Список основных публикаций официального оппонента по профилю диссертации в рецензируемых научных журналах за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1. Куляк О. Ю. Оценка кардиопротекторной эффективности инновационной лекарственной формы убихинола для внутривенного введения / О. Ю. Куляк, Е. А. Городецкая, Е. И. Каленикова, М. Н. Макарова, О. Н. Пожарицкая, & О. С. Медведев //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – №. 4. – С. 8-11. 2. Куляк О. Ю. Ограничение развития систолической и диастолической дисфункции в

результате однократного внутривенного введения нового препарата" убихинол" у крыс с инфарктом миокарда/ О. Ю. Куляк, Е. А. Городецкая, М. М. Артемьева, Е. И. Каленикова, & О. С. Медведев //Технологии живых систем. – 2018. – Т. 15. – №. 4. – С. 50-56.

3. Каленикова Е. И. Динамика тканевых уровней и редокс-статус коэнзима Q10 у крыс после внутривенного введения убихинола / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская, Н. С. Шаповал, В. Г. Макаров & О. С. Медведев //Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – №. 8. – С. 12-15

4. Каленикова Е. И. Динамика тканевых уровней и редокс-статус коэнзима Q10 у крыс после внутривенного введения убихинола / Е. И. Каленикова, Е. А. Городецкая, О. Н. Оболенская, Н. С. Шаповал, В. Г. Макаров & О. С. Медведев //Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – №. 8. – С. 12-15.

5. Дудылина А. Л. Генерация супероксидных радикалов митохондриями сердца и антиоксидантное действие водорастворимой формы убихинола-10 / А. Л. Дудылина, М. В.Иванова, А. В. Калатанова, Е. И.Каленикова, В. Г. Макаров, М. Н. Макарова ... & Э. К. Рууге //Биофизика. – 2019. – Т. 64. – №. 2. – С. 282-289.

6. Оболенская О. Н. Нейропротекторный потенциал Убихинола после внутривенного введения на модели фокальной ишемии головного мозга у крыс / О. Н.Оболенская, Е. А. Городецкая, Е.

	И. Каленикова & О. С.Медведев //Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. – 2020. – С. 127-127.
--	---

Официальный оппонент

Каленикова Е.И.

Подпись Калениковой Е.И. подтверждаю

Декан факультета фундаментальной медицины

Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования

«Московский государственный университет

имени М.В. Ломоносова»

Академик РАН

«29» августа 2022г.

Ткачук Всеволод Арсеньевич

