

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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

Нейропротективная терапия подразумевает комплекс мер, направленных на предотвращение или ослабление развития основных звеньев патобиохимического каскада, приводящего при ишемии мозга к обратимым метаболическим изменениям нейронов или их гибели. На протяжении последних десятилетий было создано множество экспериментальных моделей различных неврологических заболеваний для изучения механизмов гибели клеток. В то же время многие рандомизированные плацебоконтролируемые исследования по нейропротекции у человека при инсульте не дали положительных результатов. Более того, некоторые исследования были досрочно прекращены вследствие повышения риска негативных эффектов и отсутствия терапевтической пользы. Одним из новых подходов воздействия на уровне молекулярного каскада при ишемическом повреждении головного мозга является блокирование Na^+/H^+ обменника первой изоформы (NHE-1).

На сегодняшний день известны ингибиторы NHE-1, которые многократно проявили противоишемическое (кардиопротекторное действие) в эксперименте, однако на этапе клинических соединений были выявлены различные побочные эффекты. Вследствие того, что NHE-1 широко представлен в клетках головного мозга (нейронах, глиальных и эндотелиальных клетках мозговых капилляров), представляется целесообразным продолжить поиск соединений оказывающих нейропротекторное действие за счет ингибирования NHE-1 в клетках головного мозга.

В связи с этим исследования В.Ю. Муравьевой по изучению влияния новых производных циклических гуанидинов на Na^+/H^+ обмен, являются весьма актуальными.

Научная новизна исследования

Новизна исследования несомненна. Она заключается в изучении NHE-1–ингибирующей активности новых производных, имеющие частично встроенную гуанидиновую группу (производные 2–аминобензимидазола) и соединений, содержащих в своей структуре полностью встроенную гуанидиновую группу (производные N⁹-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола). В результате поиска высокоактивных соединений среди новых циклических гуанидинов *in vitro* на тромбоцитах кролика, выявлено соединение-лидер под лабораторным шифром РУ-1355. Исследуемое соединение по NHE-1–ингибирующему эффекту превосходило препарат сравнения зонипорид – селективный ингибитор NHE-1 .

Впервые в исследованиях *in vivo* было выявлено нейропротекторное действие соединения РУ-1355 при однократном и курсовом введении в эффективной дозе (1,12 мг/кг). Так исследуемое соединение ограничивало рост концентрации специфического маркера повреждения нейронспецифической енолазы в сыворотке крови, способствовало уменьшению зоны некроза, выраженности отека мозга, снижало проявления неврологических нарушений и восстанавливало поведенческие реакции в условиях фокальной ишемии/реперфузии головного мозга. Соединение РУ-1355 превосходило препараты глицин, магния сульфат и зонипорид. Впервые было показано, уменьшение вероятности тромбогенных осложнений вследствие уменьшения агрегации тромбоцитов, эритроцитов и нормализации вязкостных свойств крови в условиях патологии.

Впервые было установлено, что исследуемое соединение в эффективной дозе не оказывало влияния на различные нейромедиаторные модуляторы ЦНС.

Научно-практическая значимость исследования

В результате исследований *in silico*, полученная автором диссертационной работы В.Ю. Муравьевой закономерность, что вещества, имеющие частично встроенную гуанидиновую группу (производные 2-аминобензимидазола) обладают более высокой NHE-1-ингибирующей активностью по сравнению с соединениями, содержащими в своей структуре полностью встроенную гуанидиновую группу (производные N⁹-замещенные имидазо[1,2-*a*]бензимидазола) может быть использована при синтезе новых соединений. А методологические подходы по изучению нейротекторной активности - для проведения направленного поиска веществ с данным видом действия соединений с NHE-1 ингибирующей активностью.

Результаты диссертационного исследования рекомендуется использовать в некоторых разделах учебного процесса кафедр фармакологии.

Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертационной работы

Эксперименты проведены на достаточном количестве животных. При выполнении исследований использованы современные методы изучения фармакологических эффектов, выполненные на высокотехнологичном сертифицированном оборудовании в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с противоишемическим действием. Достоверность выводов не вызывает сомнения, так как представленные материалы обработаны с применением современных статистических методик и грамотно обобщены.

Общая оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа изложена на 204 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 16 рисунками, 41 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава I), главы материалы и методы (глава II), экспериментальной части (главы III-VII), обсуждения результатов, заключения,

выводов и списка литературы, включающего 180 источников, в том числе 104 зарубежных.

Во введении автор аргументирует актуальность и степень разработанности исследования, четко формулирует цель и задачи работы, приводит данные о научной новизне, научно-практической значимости, методологии и методах исследования, внедрении, степени достоверности и апробации результатов исследования, указывает положения, вынесенные на защиту.

Первая глава (литературный обзор) включает современные представления отечественных и зарубежных авторов об ингибиторах Na^+/H^+ обменника. В первом разделе рассматривается биологическая роль NHE-1: основные изоформы и их распределение в ЦНС, строение, регуляция, физиологическое значение, а также участие в патологиях головного мозга. Подробно описан механизм развития ишемического инсульта и роль NHE-1 в данной проблеме. Далее в литературном обзоре автором представлена современная классификация ингибиторов NHE-1. В заключении рассматриваются производные циклических гуанидинов как потенциальные высокоселективные ингибиторы NHE-1.

Во второй главе В.Ю. Муравьевой представлены методы экспериментальных исследований. Все исследования были одобрены локальным Этическим комитетом (протокол № 126-2011 от 15 февраля 2013 года). Исследуемые вещества синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета ведущим научным сотрудником, к.х.н. В.А. Анисимовой. Исследование *in vitro* проводили по валидированному методу D. Roskopf et.al. [1991] и K. Kusumoto [2002], модифицированному Гуровой Н.А. [2011]. Изучение NHE-1 ингибирующего действия новых производных циклических гуанидинов проводили по степени светопропускания плазмы богатой тромбоцитами.

Для исследования *in silico* использовали методы компьютерной обработки информации (пошаговый дискриминантный анализ). В условиях *in vivo* на модели фокальной церебральной ишемии-реперфузии головного мозга

у крыс проводили оценку противоишемического (нейропротекторного) действия исследуемого вещества, гемореологическую активность исследовали с использованием глобальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс, а влияние соединения РУ-1355 на тромбогенный потенциал крови изучали с помощью артериального тромбоза.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программы «GraphPad.Prism.5.0» (США). Были выбраны как параметрические, так и непараметрические методы анализа информации. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

В третьей главе автором проводили поиск *новых* ингибиторов NHE-1 среди соединений, содержащих гуанидиновую группу. Были выбраны соединения двух химических классов: производных 2-аминобензимидазола (частично встроенная в цикл гуанидинная группа) и производные N⁹-имидазо[1,2-*a*]бензимидазола (полностью встроенная гуанидинная группа в цикл). В исследования *in vitro* было выбрано вещество-лидер, которое по величине IC₅₀ достоверно превосходило препарат сравнения зонипорид и другие исследуемые соединения производные циклических гуанидинов.

По результатам пошагового дискриминантного анализа в исследованиях *in silico* было получено, что электронные параметры, центрированные на гуанидиновый фрагмент соединений с частично встроенной в цикл гуанидиновой группой, статистически значимо отличаются от данных показателей веществ с полностью встроенной, что вероятно и определяет уровень NHE-1 ингибирующей активности.

В четвертой главе представлен подробный анализ выраженного противоишемического влияния нового соединения РУ-1355 - 2-амино-1-морфолиноэтил-3-(4-фторфенацил)бензимидазолия хлорид на модели 60-ти минутной ишемии и последующей реперфузией при однократном и курсовом введении у крыс. Первичное нейропротекторное действие при фокальной ишемии/реперфузии исследуемого соединения было подтверждено на основании следующих показателей: ограничения роста уровня NSE

(нейроспецифической енолазы) в сыворотке крови, уменьшения выраженности неврологических нарушений (шкала Гарсия), морфометрических изменений (уменьшение зоны некроза и отека головного мозга), а также восстановления поведенческих реакций (тест «открытое поле»).

В пятой главе автор приводит результаты *in vivo* по исследованию влияния соединения РУ-1355 на тромбогенный потенциал и вязкость крови в условиях патологии. Так было показано, что соединение РУ-1355 способствовало нормализации вязкости крови, снижению агрегации эритроцитов и тромбоцитов. А также в условиях внутрисосудистого тромбоза исследуемое соединение удлиняло время образования тромба.

Шестая глава посвящена анализу взаимодействия соединения РУ-1355 с различными модуляторами ЦНС. Диссертантом было показано, что существенного влияния соединение РУ-1355 в эффективной дозе на изученные нейромедиаторные системы не оказывает. В дозе 5 мг/кг было выявлено незначительное влияние на некоторые модуляторы ЦНС, однако данные были статистически незначимы.

В седьмой главе подробно были исследованы общетоксикологические свойства соединения РУ-1355 различных дозах. В результате проведенного анализа установлено, что вещество РУ-1355 в дозе 1,12 и 5,0 мг/кг не влияло на эмоциональное поведение животных, нервно-мышечную возбудимость, двигательную активность, мышечную координацию и не вызывало изменений со стороны вегетативной нервной системы. В возрастающих дозах 25, 125 и 250 мг/кг, наблюдали снижения спонтанной двигательной активности, координации, расслабляющего эффекта, угнетение горизонтальной активности и уровня эмоционального реагирования и в максимально изучаемой дозе (250 мг/кг) была показана гибель животных.

В восьмой главе приводится подробное обсуждение полученных результатов, их сопоставление с современными литературными данными, рассматриваются перспективы дальнейшего поиска веществ с NHE-1-ингибирующей активностью.

Диссертация завершается 7 выводами, основанными на результатах анализа полученных данных. Практические рекомендации обоснованы, информативны, имеют важное значение. Основные выводы диссертации соответствуют цели и поставленным задачам. Все задачи решены, выводы обоснованы, логически вытекают из представленного материала и дают основание для практических рекомендаций.

Автореферат отражает основные положения диссертации и оформлен в соответствии с современными требованиями. По материалам диссертации опубликовано 29 работ (в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых Минобрнауки РФ, 3 патента на изобретения).

Принципиальных возражений по работе нет, однако имеются вопросы, которые носят уточняющий характер и не умаляют общей положительной оценки работы.

При прочтении диссертации возникли следующие вопросы:

- 1.** Из представленного вами материала не возникает сомнений, что данный класс цитопротекторов представляет огромный интерес! Какая есть информация о том какие фирмы или организации в мире занимаются изучением ингибиторов Na^+/H^+ -обменника? Используются ли они в клинической практике в настоящее время?
- 2.** В литературном обзоре вы приводите данные о том, что в настоящее время известно 11 изоформ обменника, которые располагаются в различных органах и клетках, почему вы считаете, что соединение РУ-1355 влияет именно на Na^+/H^+ -обменник первой изоформы?
- 3.** Так на основании и литературных данных и длительном изучении на кафедре фармакологии ВолгГМУ известно, что производные бензимидазола обладают широким спектром биологической активности: антиоксидантной, антиагрегантной, противоишемической, ангигипоксантной и др. Почему вы связываете нейропротекторное действие вашего соединения с ингибированием Na^+/H^+ -обменника?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, 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 законченной квалификационной научно-исследовательской работой. Совокупность теоретических положений, которые можно квалифицировать как новое достижение в развитии фармакологии, направленное на решение важной проблемы по созданию эффективных лекарственных средств, обладающих нейропротекторной активностью.

Проведенная работа диссертантом полностью удовлетворяет всем 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.

Заведующий кафедрой
фармакологии Белгородского
государственного национального
исследовательского университета.
доктор медицинских наук,
профессор

М.В. Покровский

« » _____ 2016 года

Адрес: РОССИЯ, 308015, Белгород, ул. Победы, 85

Телефон: 8 910 314 73 93

E-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Список опубликованных работ, близких тематике диссертационного исследования

1. Мясищева О.В., Покровский М.В., Гуреев В.В., Анциферов О.В., Мартынов М.А. Экспериментальные модели повреждения головного мозга // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина, фармация. №11, 2014, С. 123-126.
2. Мартынова О.В., Гуреев В.В., Покровский М.В., Мартынов М.А., Солгалова А.С., Анциферов О.В. Моделирование тотальной ишемии головного мозга у крыс// Сетевой журнал «Научный результат». Серия «Медицина и фармация». – Т.1, №4(6), 2015.
3. Protective Effects of Recombinant Erythropoietin in Ischemia of the Retina: The Role of Mechanisms of Preconditioning / Anna S. Shabelnikova, Vladimir D. Lutsenko, Mikhail V. Pokrovskii et al. // Research Journal of Medical Sciences. – 2015. – Vol. 9. – Issue: 4: 200-203.
4. Analysis of the Protective Properties of Erythropoetin and Nicorandil on the Basis of the Model of the Retina Ischemia/Reperfusion / Anna Sergeevna Shabelnikova, Anna Alexandrovna Peresyapkina, Mikhail Vladimirovich Pokrovskiy et al. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – 5(6): 1335-1339.