

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Прокофьева Игоря Игоревича «Роль системы оксида азота в кардиопротекторном действии производных нейроактивных аминокислот», представленную 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 темы диссертационной работы

В настоящее время расстройства сердечно-сосудистой системы во всем мире являются одной из основных причин смертности населения. Известно также, что увеличение влияния психосоциальных факторов, вызывающих стресс, служит одним из основных факторов риска заболеваний сердца и сосудов. Так, под воздействием длительного и мощного по интенсивности стресса запускается целый каскад реакций, направленных как на поддержание гомеостаза организма, так и приводящих к серьезным нарушениям функционирования многих органов и систем. Происходит перегрузка кардиомиоцитов кальцием, активируются процессы липопероксидации, нарушается тканевое дыхание, что, в конечном счете, приводит к снижению сократительной функции миокарда.

К стресс-лимитирующим системам ограничивающим развитие стресса относится и оксид азота (NO), который подавляет активность центрального и периферического звеньев стресс-реакции.

Поэтому следует считать обоснованным поиск лекарственных средств, ограничивающих повреждающее действие стресса на сердце и модулирующих NO-ергическую систему. В качестве таких веществ можно рассматривать нейроактивные аминокислоты и их производные, так как в многочисленных исследованиях показано наличие у них кардиопротекторных свойств.

В соответствии с этим, актуальность диссертационного исследования Прокофьева Игоря Игоревича, посвященного оценке роли системы оксида азота в кардиопротекторном действии нового производного глутаминовой кислоты – глүфимета и производного ГАМК – фенибута, не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования

Автором впервые показан периферический NO-ергический механизм действия производного глүфимета и фенибута в условиях *in vitro*. Обнаружено, что исследуемые соединения в условиях острого стрессорного воздействия приводят к снижению уровня конечных метаболитов NO в гомогенатах сердца, головного мозга и сыворотке крови, концентрации продуктов ПОЛ, повышают активность антиоксидантных ферментов в митохондриях клеток сердца и головного мозга, показатели дыхательной функции митохондрий, нормализуют параметры системы гемостаза и АД. Впервые выявлена реализация вышеописанных эффектов при селективной блокаде нейрональной NOS и отсутствие таковой при ингибировании iNOS, что может указывать на участие последней в кардиопротективном действии изучаемых производных глутамата и ГАМК. Впервые у глүфимета и фенибута обнаружена способность к снижению концентрации iNOS, цГМФ и конечных метаболитов NO в перитонеальных макрофагах мышей, а также показан центральный NO-ергический компонент кардиопротективного действия глүфимета.

Научно-практическая значимость исследования

Результаты проведенного исследования открывают новые аспекты в механизме кардиопротекторного действия производного ГАМК – фенибута и нового производного глутаминовой кислоты – глүфимета, связанные с участием системы оксида азота. Выявленная способность у изучаемых соединений ингибировать экспрессию индуцибельной изоформы NO-синтазы может

послужить основой для дальнейшего поиска в ряду производных нейроактивных аминокислот веществ, обладающих кардиопротекторным действием и влияющих на систему NO, с целью создания лекарственных препаратов, ограничивающих повреждение миокарда в условиях воздействия различных негативных факторов.

Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертационной работы

В процессе диссертационного исследования автором использовались современные методы изучения участия системы оксида азота в реализации кардиопротекторного действия глүфимета и фенибута, соответствующие руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Достоверность полученных результатов подтверждается большим объемом цифровых, статистически обработанных данных, полученных в экспериментах на большом количестве животных. Все основные положения диссертационного исследования аргументированы и не вызывают сомнений.

Общая оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационное исследование изложено на 166 страницах машинописного текста, проиллюстрировано 8 таблицами и 20 рисунками. Диссертация построена по традиционному типу и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, научно-практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, который включает 313 источников (60 отечественных и 253 зарубежных авторов).

Во введении диссертант обосновывает актуальность темы исследования и степень разработанности проблемы, формулирует цель и задачи, поставленные для ее достижения, научную новизну, теоретическую и практическую

значимость, т.е. все положения, предъявляемые к вводной части диссертационной работы.

В первой главе автором представлен обзор литературных данных по изучаемой проблеме. При описании физиологической роли системы оксида азота сделан акцент на ее участие в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы. Приведены также данные о вероятных механизмах взаимодействия NO и нейромедиаторных систем (глутамат-, ГАМК-ергической), которые обуславливают выбор соединений для диссертационного исследования. Много внимания уделено патогенезу стрессорного повреждения миокарда и показано стресс-лимитирующее действие системы оксида азота.

Во второй главе описаны используемые в диссертационной работе материалы и методы исследования. Влияние глуфимета и фенибута на инотропную реакцию изолированных предсердий интактных и стрессированных крыс было изучено в условиях *in vitro* и *ex vivo* при стимуляции адreno- и холинорецепторов дофамином и ацетилхолином на фоне блокады NO-синтаз метиловым эфиром нитро-L-аргинина. Стрессорное воздействие автор моделировал путем подвешивания крыс за дорсальную кожную шейную складку зажимом Кохера на 24 часа. NO-ергический механизм кардиопротекторного действия в условиях стрессорного повреждения миокарда был исследован при селективном ингибировании нейрональной NOS 7-нитроиндазолом и индуцибельной NOS – амингуанидином. При этом в гомогенатах сердца и головного мозга диссертант проводил определение конечных метаболитов оксида азота с использованием реактива Грисса, а в митохондриях клеток сердца и головного мозга – концентрации продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов, дикетонных, малонового диальдегида), активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы) и дыхательной функции митохондрий.

Последняя определялась полярографическим методом с измерением концентрации кислорода с помощью электрода Кларка при активации I и II дыхательных комплексов. Участие NO в центральном механизме кардиопротекторного действия производных нейроактивных аминокислот автор оценивал по изменению систолического АД на фоне неселективного ингибирования NO-синтаз при их введении в боковые желудочки мозга наркотизированных крыс. В данной главе также описана методика получения активированных липополисахаридом перитонеальных макрофагов для изучения влияния глуфимета и фенибута на экспрессию индуцибельной NOS. Для этого автор проводил определение концентрации iNOS, цГМФ методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

В третьей главе приведены результаты изучения *in vitro* и *ex vivo* инотропного влияния глуфимета и фенибута на изолированных предсердиях интактных и стрессированных крыс при активации симпатической и парасимпатической систем и неселективной блокаде NO-синтаз. Показано, что исследуемые производные ГАМК и глутамата предотвращают прирост сократимости препарата предсердий при стимуляции β_1 -адренорецепторов при различной частоте навязанного ритма и улучшают расслабление миокарда. Однако эти эффекты нивелировались неселективной блокадой NOS в условиях *in vitro*, что, вероятно, и свидетельствует об участии NO-системы в реализации периферического кардиопротективного действия.

Четвертая глава содержит данные, отражающие участие NO-ергической системы в механизме кардиопротекторного действия производных нейроактивных аминокислот при остром стрессорном повреждении миокарда. Автором было выявлено, что иммобилизационно-болевое воздействие приводит

к увеличению концентрации метаболитов оксида азота в сыворотке крови и тканях сердца и головного мозга, что объясняет неконтролируемое увеличение синтеза NO индуцибельной NO-синтазой в результате стресс-реакции. Вследствие этого развивается оксидативный стресс и митохондриальная дисфункция в клетках сердца и головного мозга, что и было продемонстрировано диссертантом. Раздельное введение животным глуфимета и фенибута ограничивало повреждающее влияние стресса на изучаемые органы. Важно отметить, что при ингибировании iNOS вышеописанные эффекты были значительно менее выражены. На основании этого автором сделано предположение о влиянии исследуемых производных нейроактивных аминокислот на активность или экспрессию индуцибельной NO-синтазы.

В пятой главе представлено описание результатов по оценке центрального и периферического компонента кардиопротекторного действия глуфимета и фенибута. Автором обнаружено, что при введении L-NAME и глуфимета в боковые желудочки мозга крысы не происходит существенного изменения систолического артериального давления, а без блокады NOS производное глутамата оказывало гипотензивное действие. Аналогичное введение фенибута вызывало уменьшение уровня АД как при блокаде NOS, так и ГАМК_A-рецепторов. Показано также снижение под влиянием глуфимета и фенибута концентрации iNOS, цГМФ и конечных метаболитов NO в ЛПС-активированных перитонеальных макрофагах мышей в условиях *in vitro* и *ex vivo*, что, вероятно, свидетельствует о подавлении изучаемыми производными нейроактивных аминокислот экспрессии индуцибельной NOS.

Далее следует обсуждение полученных результатов, их сопоставление с современными литературными данными, рассматривается перспективность дальнейшего поиска веществ с кардиопротективным действием, подавляющих экспрессию iNOS, в ряду производных ГАМК и глутамата.

Выводы диссертации соответствуют цели и поставленным задачам и дают основание для практических рекомендаций.

Автореферат отражает основные положения диссертации и оформлен в соответствии с современными требованиями.

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из которых 7 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

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

1. Почему была выбрана именно эта модель стресса, основанная на иммобилизационно-болевым воздействии?

2. Планируется ли дальнейшее изучение кардиопротекторных свойств глүфимета и фенибута на других моделях повреждения миокарда?

Поставленные вопросы носят уточняющий характер и не влияют на общее положительное впечатление от представленного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Прокофьева Игоря Игоревича на тему: «Роль системы оксида азота в кардиопротекторном действии производных нейроактивных аминокислот», выполненная по руководством доктора биологических наук Перфиловой Валентины Николаевны и при научном консультировании члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Тюренкова Ивана Николаевича и представленная 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, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи - участия системы

оксида азота в кардиопротекторных эффектах производных глутаминовой кислоты и ГАМК – глумимета и фенибута, имеющее существенное значение для фармакологии и клинической фармакологии.

По актуальности темы, методическому уровню, объему выполненных исследований, новизне и научно-практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым действующим «Положением о порядке присуждения ученых степеней» (утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями постановления Правительства Российской Федерации 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 её автор, Прокофьев Игорь Игоревич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент:
Заведующий лабораторией фармакологии
цереброваскулярных расстройств
ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова»,
З.д.н. РФ, д.м.н., профессор



Р.С. Мирзоян

Подпись Р.С. Мирзояна заверяю:
Ученый секретарь ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», к.б.н.

В.А. Крайнева

Адрес: Россия, 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8
Телефон: 8 (495)601-24-19, 8 (499) 151-18-81
Адрес электронной почты:
zakusovpharm@mail.ru
cerebropharm@mail.ru



22 ноября 2017г.

**Сведения об официальном оппоненте
по диссертации Прокофьева Игоря Игоревича «Роль системы оксида азота в кардиопротекторном действии производных нейроактивных аминокислот» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология**

Ф.И.О. оппонента	Мирзоян Рубен Симонович
Год рождения, гражданство	1938, РФ
Учёная степень	доктор медицинских наук
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология
Ученое звание (по специальности, кафедре)	профессор
Шифр специальности и отрасль науки	14.03.06-фармакология, клиническая фармакология, медицинские науки
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
Занимаемая должность	Заведующий лабораторией фармакологии цереброваскулярных расстройств
Почтовый индекс, адрес	125315, Россия, г. Москва, ул. Балтийская, 8
Телефон	8 (495) 601-2419
Адрес электронной почты	cerebropharm@mail.ru
Список основных публикаций официального оппонента по профилю диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>1. Ганьшина, Т.С. Особенности цереброваскулярного эффекта глутаминовой кислоты / Т.С. Ганьшина, Е.В. Курза, И.Н. Курдюмов, Д.В. Масленников, Р.С. Мирзоян // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2016. - Т. 79, № 3. - С. 9-12.</p> <p>2. Макарова, Л.М. Влияние производного глутаминовой и аповинкаминовой кислот на метаболизм головного мозга в постишемическом периоде / Л.М. Макарова, М.А. Приходько, В.Е. Погорельий, С.Я. Скочилова, Р.С. Мирзоян // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. - Т. 77, № 2. - С. 12-15.</p> <p>3. Ганьшина, Т.С. О ГАМК-ергическом механизме цереброваскулярного эффекта антагониста NMDA-рецепторов - МК-801 / Т.С. Ганьшина, А.В. Гнездилова, Е.В. Курза, А.И. Турилова, Р.С. Мирзоян // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. - Т. 77, № 6. - С. 8-12.</p> <p>4. Масленников, Д.В. Особенности цереброваскулярного эффекта мелатонина и нимодипина в условиях раздельной и сочетанной сосудистой патологии мозга и сердца / Д.В. Масленников, М.А. Лебедева, А.В. Гнездилова, Т.С. Ганьшина, Р.С. Мирзоян // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2015. - Т.78, №7. - С. 42-43.</p>

	5. Мирзоян, Р.С. Цереброваскулярная фармакология отдельной и сочетанной сосудистой патологии мозга и сердца / Р.С. Мирзоян, Т.С. Ганьшина, Н.А. Хайлов [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2014. - Т.77, №3. - С. 3-8.
--	---

Заведующий лабораторией фармакологии
цереброваскулярных расстройств
ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», з.д.н. РФ,
д.м.н., профессор



Р.С. Мирзоян

Подпись Р.С. Мирзояна заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ
«НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова», к.б.н.



В.А. Крайнева