

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора
Якушевой Елены Николаевны на диссертацию
Воронина Михаила Владимировича «Молекулярные механизмы
фармакологических эффектов фабомотизола», представленную к защите на
соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы исследования

Согласно эпидемиологическим данным, заболеваемость нейродегенеративными заболеваниями и тревожно-депрессивными расстройствами неуклонно растёт, представляя собой не только медицинскую, но и социальную проблему. В тоже время, применяемые в медицинской практике подходы к их фармакотерапии недостаточно эффективны. До настоящего времени не предложено лекарственных средств этиотропного и эффективного патогенетического лечения нейродегенеративных болезней. Лекарства, применяемые для терапии тревожно-депрессивных расстройств, отличаются индивидуальными особенностями действия, не влияя приблизительно на 30% больных, обладают побочными эффектами. Доказано, что в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и тревожно-депрессивных расстройств возникают нарушения физиологической структуры белковых молекул, что обуславливает изменение функции рецепторов и ионных каналов ЦНС. Работа М.В. Воронина посвящена изучению механизмов действия нового лекарственного препарата фабомотизол. Фабомотизол успешно применяется в медицинской практике как анксиолитик, который препятствует вызванному эмоциональным стрессом снижению связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A рецептора. Помимо анксиолитического действия фабомотизол проявляет нейропротекторные и антидепрессивные свойства в стандартных экспериментальных моделях. Поэтому, выяснение механизмов способности препарата нивелировать нарушения функционирования рецепторов и выявление их вклада в уникальный спектр

фармакологической активности обуславливает актуальность постановки задач по изучению первичных молекулярных механизмов действия фабомотизола.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций,
сформулированных в диссертации**

В диссертации Воронина М.В. поставлена цель выявить первичные молекулярные мишени фабомотизола и установить их вклад в формирование анксиолитического и нейропротекторного эффектов препарата. Согласно цели исследования сформулировано семь научных задач. Выводы диссертации и положения, выносимые на защиту, обоснованы включением в эксперимент необходимых контрольных и экспериментальных групп, применением адекватных экспериментальных моделей и современных методов исследования, достаточным объемом материала и соответствующими методами статистической обработки данных.

Обращает внимание продуманный подход к планированию начального этапа исследования – идентификации первичных мишеней действия фабомотизола. Проведено скрининговое радиолигандное исследование связывания препарата с 86 рецепторными белками. Отбор белков-кандидатов проведён на основании сопоставления данных об их физиологической роли, фармакофорных моделях, эндогенных и экзогенных лигандах со спектром фармакологических эффектов и структурой молекулы фабомотизола. С помощью конкурентного радиолигандного анализа установлено, что фармакологически значимыми первичными мишенями фабомотизола являются лиганд-зависимый шаперон Sigma1R, хинонредуктаза 2 (NQO2) (MT₃ рецептор) и моноаминоксидаза-A (MAO-A).

Обратимое ингибирующее влияние фабомотизола на активность MAO-A и NQO2 доказано в биохимических исследованиях *in vitro* с применением стандартных субстратов. Фабомотизол ингибирует NQO2 по смешанному типу, что наглядно продемонстрировано с использованием спрямляющих координат. Агонистическое влияние фабомотизола на Sigma1R доказано флюоресцентной микроскопией на культуре клеток гиппокампа мыши HT-22. Фабомотизол, как и прототипные агонисты Sigma1R, вызывает внутриклеточное перераспределение

шаперона из эндоплазматического ретикула к цитоплазматической мембране.

Зависимость анксиолитического действия фабомотизола от его агонистического влияния на Sigma1R доказана в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» с применением селективных антагонистов Sigma1R. Антагонисты Sigma1R препятствовали вызываемому фабомотизолом снижению тревожного поведения мышей. Вклад Sigma1R и NQO2 в цитопротекторные свойства фабомотизола выявлен с использованием оригинальных моделей окислительного стресса, вызванного хинонными соединениями, с применением селективных антагонистов Sigma1R и сравнением защитного эффекта фабомотизола с действием его метаболита M-11, селективно ингибирующего NQO2.

Нейропротекторное действие фабомотизола доказано в экспериментальной модели болезни Паркинсона с интрастриатным введением 6-гидроксидофамина. Фабомотизол при профилактическом и терапевтическом введении препятствовал снижению уровня дофамина в повреждённом стриатуме и нарушениям двигательной активности опытных мышей. Установлено, что при профилактическом введении фабомотизол восстанавливает экспрессию тирозингидроксилазы в нейронах чёрной субстанции. В работе выявлены сходные нейропротекторные эффекты фабомотизола и селективного агониста Sigma1R PRE-084, что согласуется с установленным *in vitro* агонистическим влиянием препарата на Sigma1R. Вклад Sigma1R шаперона в нейропротекторное действие фабомотизола выявлен с применением селективных антагонистов Sigma1R, которые препятствовали действию как фабомотизола, так и PRE-084. Сравнение эффектов фабомотизола и его основного метаболита M-11, избирательно ингибирующего NQO2, позволило установить роль NQO2 в нейропротекторном действии фабомотизола в модели болезни Паркинсона. Соединение M-11 уступало в эффективности фабомотизолу, вызывая сходное нейропротекторное действие в большей дозе.

Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением биофизических, биохимических, клеточных, иммунофлюоресцентных

морфологических, поведенческих методик, реализованных на современном высокоточном оборудовании. Необходимо подчеркнуть, что все использованные методы четко соответствовали поставленным задачам исследования, что в комплексе позволило получить обоснованное представление о молекулярных механизмах действия, лежащих в основе фармакологических эффектов фабомотизола.

Таким образом, выводы и научные положения диссертации Воронина М.В. являются логичным следствием результатов исследований, соответствуют цели и задачам работы. Совокупность результатов исследований даёт основание для приведённых в диссертации практических рекомендаций о расширении показаний к применению фабомотизола для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций обусловлена достаточным объёмом экспериментальных выборок, проверкой данных экспериментов на сходимость и воспроизводимость, корректным применением методов математической обработки и статистического анализа.

Научная новизна диссертационной работы Воронина М.В. определяется выявлением молекулярных механизмов действия отечественного оригинального лекарственного средства фабомотизола, обладающего помимо анксиолитического эффекта антидепрессивным и нейропротекторным влияниями. Установлены первичные белковые мишени фабомотизола – Sigma1R шаперон, хинонредуктаза 2 и моноаминоксидаза-А. Показано, что фабомотизол ингибирует ферменты NQO2 и MAO-A и обладает свойствами агониста шаперона Sigma1R. С использованием селективных антагонистов Sigma1R доказана зависимость анксиолитического эффекта фабомотизола от Sigma1R. Нейропротекторная активность фабомотизола установлена в *in vivo* модели болезни Паркинсона при курсовом профилактическом и терапевтическом применении. С применением селективных лигандов выявлен вклад Sigma1R и NQO2 в цитопротекторный и нейропротекторный эффекты

фабомотизола в *in vitro* моделях окислительного повреждения и *in vivo* модели болезни Паркинсона.

Теоретическая и практическая значимость результатов работы

Теоретическая значимость исследования заключается в выявлении новых механизмов действия оригинального препарата фабомотизола. Результаты исследования обосновывают возможность достижения широкого спектра нейротропных эффектов посредством активации шаперонной функции. Установлено, что ингибирующее влияние фабомотизола на фермент NQO2 способствует защите клеток от окислительного повреждения, опосредованного хинонными соединениями. Продемонстрировано, что достижение нейропротекторного действия обусловлено синергичной активацией шаперона Sigma1R и ингибированием NQO2.

Практическая значимость диссертации вытекает из установленных в работе новых механизмов действия фабомотизола и заключается в расширении показаний к применению препарата с целью профилактики и лечения тревожно-депрессивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний, в том числе на основе новых подходов к адъювантной фармакотерапии. Выявление фармакологических мишеней фабомотизола и эффектов их регуляции в моделях неврологических заболеваний создаёт научный задел для поиска веществ-кандидатов и разработки эффективных средств фармакотерапии заболеваний ЦНС.

Общая характеристика работы. Оценка содержания работы, её завершённости и оформления

Диссертация Воронина М.В. изложена на 225 страницах, содержит 45 рисунков и 18 таблиц. Работа имеет классическую структуру и включает введение, основную часть, заключение, перечень сокращений и условных обозначений, список литературы. Основная часть диссертации представлена обзором литературы, изложением материалов и методов, результатов исследования и их обсуждением. Введение содержит обоснование актуальности темы диссертации, цель исследования, выносимые на защиту положения. Для достижения цели работы автором сформулировано семь научных задач. Разработанность темы исследования

основана на лаконичном анализе результатов доклинических и клинических исследований спектра фармакологической активности фабомотизола. Введение включает аргументацию новизны, теоретической и практической значимости, степени достоверности, методологии исследования. Дана информация об апробации результатов диссертационного исследования и публикациях по теме работы, охарактеризован личный вклад автора.

Обзор литературы М.В. Воронина основан на тщательном анализе большого объема источников научной литературы. Сложные, многоплановые результаты исследований изложены автором последовательно и доступно, что свидетельствует о свободном владении материалом. Основная часть обзора посвящена описанию двух установленных белковых мишеней фабомотизола – шаперона Sigma1R и фермента хинонредуктазы 2. Для этих мишеней на основании актуальных научных источников проанализированы экспрессия генов, клеточная локализация, структура белков и их активных центров, функциональная активность. Подробная характеристика Sigma1R и NQO2 позволила обосновать схему экспериментов диссертационного исследования.

В главе «Материалы и методы» дано полное описание *in vitro* и *in vivo* методов исследования. Охарактеризованы экспериментальные животные, условия их содержания, клеточные культуры, применяемые фармакологические анализаторы и химические реактивы. Детально описаны условия окислительного клеточного повреждения, *in vivo* модель болезни Паркинсона, метод изучения тревожного поведения мышей. В главе отмечается наличие положительных заключений комиссии по биоэтике и соответствие обращения с экспериментальными животными принципам 3R. Подробно изложены методы математической обработки и статистического анализа экспериментальных данных.

В главе «Результаты работы» чётко и убедительно отражены радиолигандное изучение аффинности фабомотизола к кандидатным рецепторным белкам, определение влияния фабомотизола на функциональную активность ферментов MAO-A, NQO2 и Sigma1R шаперона, выявление роли NQO2 и Sigma1R в цитопротекторном, анксиолитическом и нейропротекторном эффектах

фабомотизола. Результаты экспериментов представлены в виде таблиц, столбчатых диаграмм, рисунков и дополнены исчерпывающими примечаниями. Корректный статистический анализ данных с использованием адекватных описательных статистик и критериев позволяет не сомневаться в интерпретации результатов исследования. Результаты работы опубликованы в рекомендованных ВАК научных журналах, что подтверждено ссылками на публикации с указанием соавторов.

Обсуждение результатов включает глубокий анализ роли Sigma1R шаперона и фермента NQO2 в фармакодинамике фабомотизола, который проведён с привлечением современной научной литературы. Глава содержит научное обоснование агонистического влияния фабомотизола на Sigma1R, детально разобраны зависимые от Sigma1R механизмы анксиолитического и нейропротекторного эффектов препарата. Проанализированы современные концепции патогенеза нейродегенеративных заболеваний с описанием вклада нарушений метаболизма катехоламиновых нейромедиаторов в механизм окислительного стресса. Приведены убедительные доводы, позволяющие рассматривать ингибирование NQO2 в качестве нового перспективного подхода к нейропротекторной терапии.

Заключение диссертации содержит выводы и патогенетическое обоснование расширения показаний к применению фабомотизола. Девять выводов соответствуют задачам исследования и положениям, выносимым на защиту. Практические рекомендации обосновывают перспективу расширения показаний к назначению и целесообразность организации клинических исследований фабомотизола для профилактики и лечения болезни Паркинсона, адъювантной терапии депрессивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний.

Библиография диссертации включает 836 источников, из которых 57 отечественных и 779 зарубежных. В библиографии преобладают научные публикации в высокорейтинговых научных изданиях за последние 10 – 15 лет.

Научный материал изложен последовательно и логично. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к оформлению докторской диссертации.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат соответствует содержанию диссертационной работы, отражает основные результаты исследования, оформлен в соответствии с требованиями ВАК при Минобрнауки России. Диссертация соответствует специальности 3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология.

Публикации по теме диссертации и апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 42 работы, в том числе 24 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и индексируемых в базах Web of Science и Scopus, из которых 7 статей в изданиях Q1-Q2 WoS JCR. Основные результаты работы многократно доложены на съездах и конгрессах российских фармакологов и физиологов, отечественных и зарубежных научных конференциях.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Принципиальных замечаний и недостатков в содержании и оформлении диссертации не выявлено, встречаются отдельные опечатки, не влияющие на положительное восприятие материала.

В плане дискуссии возникают следующие вопросы:

1. Какие особенности структуры фабомотизола в сравнении с метаболитом М-11 могут обеспечивать его более высокую эффективность и мультитаргетное действие?
2. Какие нейротропные препараты помимо фабомотизола и мелатонина блокируют хинонредуктазу?
3. Хинонредуктаза – это мишень реализации нейропротекторного действия препарата или данный фермент способен также вносить вклад в мембраностабилизирующий эффект?

Заключение

Диссертация Воронина Михаила Владимировича «Молекулярные механизмы фармакологических эффектов фабомотизола» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок решена научная проблема выявления молекулярных

механизмов фармакологических эффектов оригинального отечественного лекарственного средства фабомотизола, имеющая важное значение для фармакологии и клинической фармакологии.

По актуальности, научной новизне, научно-практической значимости, количеству и качеству публикаций, оформлению диссертация полностью соответствует критериям докторской диссертации Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в действующей редакции), а её автор, Воронин Михаил Владимирович, заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук (14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология),
профессор

Елена Николаевна Якушева

Подпись профессора Е.Н. Якушевой заверяю:
проректор по научной работе и инновационному развитию
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор



И.А. Сучков

«21» мая 2024 г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9
Телефон/Факс: (4912) 97-18-01
Эл. почта: rzgmu@rzgmu.ru