

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Ключник Татьяны Павловны 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**

Одной из медицинских проблем, требующих новых решений, является недостаточный выбор эффективных средств фармакотерапии тревожно-депрессивных расстройств, а также нейродегенеративных заболеваний. Механизм действия подавляющего большинства используемых препаратов связан с непосредственным влиянием на системы нейротрансмиссии. Вместе с тем, в последнее десятилетие было показано, что одним из ключевых патогенетических звеньев заболеваний мозга (включая эндогенные психические и нейродегенеративные заболевания) является нейровоспаление. С процессом нейровоспаления ассоциирована повышенная продукция свободных радикалов и других нейротоксических метаболитов, вызывающих повреждение структуры мембран, ДНК и белков. Воспаление и ассоциированные с ним процессы можно рассматривать как перспективные мишени, воздействие на которые будет способствовать снижению проявления той или иной психопатологической симптоматики при психических и нейродегенеративных заболеваниях.

В рассматриваемом диссертационном исследовании для этой цели выбран оригинальным отечественный лекарственный препарат фабомотизол. Этот препарат успешно применяется в медицинской практике как анксиолитик, не обладает побочными эффектами, характерными для транквилизаторов бензодиазепинового ряда. В фундаментальных фармакологических исследованиях также установлено, что фабомотизол проявляет антидепрессивные и нейропротекторные свойства. То есть спектр

фармакологической активности фабомотизола свидетельствует о его возможном влиянии на молекулярных мишени, вовлеченные в патогенез психических и нейродегенеративных заболеваний. Выявление и характеристика этих мишеней является необходимым условием для обоснования использования препарата не только как анксиолитика, но также в качестве нейропротекторного средства.

---

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

Целью диссертационного исследования определено выявление первичных молекулярных мишеней фабомотизола и установление их вклада в формирование анксиолитического и нейропротекторного эффектов препарата. Автором сформулировано 7 научных задач, разработан дизайн исследований, выбраны адекватные для достижения цели методические подходы и экспериментальные модели.

Для поиска первичных мишеней фабомотизола проведено скрининговое радиолигандное исследование взаимодействия препарата с 86 рецепторами, регуляторными сайтами ферментов метаболизма моноаминов и транспортеров моноаминов и аминокислот. Алгоритм исследования был основан на данных о физиологической роли этих белков в эффектах, соответствующих выявленному спектру действия фабомотизола, и о структурном сходстве молекулы фабомотизола с их эндогенными лигандами и известными фармакологическими препаратами. В результате радиолигандного анализа установлено, что наибольшей аффинностью к фабомотизолу обладают шаперон Sigma1R, регуляторные сайты ферментов хинонредуктазы 2 (NQO2) и MAO-A. Основной метаболит фабомотизола M-11 проявил значимое сродство только к NQO2.

Определив первичные мишени действия фабомотизола, автор переходит к изучению влияния препарата на их функциональную активность. Анализ ферментативной кинетики показал, что фабомотизол является относительно слабым обратимым ингибитором MAO-A, что может вносить вклад в его

антидепрессивное влияние. Ингибирование фабомотизолом NQO2 также обратимо и происходит по смешанному типу, что указывает на наличие у препарата способности препятствовать окислительному стрессу.

Активация Sigma1R агонистами приводит к внутриклеточному перераспределению шаперона из микросом в область ядра и клеточной мембраны. В работе М.В. Воронина подобный эффект обнаружен иммунофлюоресцентным методом при инкубации клеток НТ-22 с фабомотизолом и дифференциальным центрифугированием гомогената головного мозга мышей после введения препарата.

Зависимость анксиолитического эффекта фабомотизола от Sigma1R продемонстрирована в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Стандартные антагонисты Sigma1R блокировали анксиолитико-подобное действие фабомотизола.

Сочетание в механизме действия фабомотизола активации шаперонной функции и ингибирования NQO2 логично предполагает наличие у препарата цитопротекторных свойств. Для этого автором применён оригинальный подход регистрации повреждений ядерной ДНК. Эксперименты выполнены *in vitro* на моделях окислительного стресса, вызванного хинонными соединениями. Сравнительное исследование с использованием селективных агонистов и антагонистов доказало участие Sigma1R и NQO2 в цитопротекторном действии фабомотизола. В диссертации описан также выраженный цитопротекторный эффект метаболита фабомотизола М-11, который не опосредован Sigma1R. Тем не менее, М-11 может вносить существенный вклад в антирадикальное действие фабомотизола *in vivo*.

Логичным и очень красивым завершением цепочки экспериментов, проведенных М.В. Ворониным, стало изучение нейропротекторного действия фабомотизола в экспериментальной модели болезни Паркинсона с интрастриатным введением 6-гидроксидофамина. Автором установлено, что фабомотизол восстанавливал нарушенные нейрохимические и двигательные показатели опытных мышей как при профилактическом, так и

терапевтическом введении. Связь вызванного фабомотизолом восстановления уровней дофамина в повреждённом стриатуме и экспрессии тирозингидроксилазы в нейронах ипсилатеральной чёрной субстанции подтверждена корреляционным анализом. Применение селективных лигандов Sigma1R и NQO2 позволило выявить вклад обеих мишеней в цитопротекторную и нейропротекторную активность фабомотизола. Стандартный антагонист Sigma1R препятствовал восстановлению фабомотизолом уровня дофамина в стриатуме и двигательной активности мышей в тесте «вращающийся стержень». Кластерным анализом убедительно продемонстрировано сходство нейропротекторных эффектов фабомотизола и прототипного агониста Sigma1R PRE-084. Участие NQO2 в антипаркинсоническом действии фабомотизола обосновано сравнением эффектов фабомотизола и его основного метаболита М-11, избирательно взаимодействующего с регуляторным сайтом NQO2. Фабомотизол оказывал сходное по выраженности с М-11 нейропротекторное действие в меньшей дозе. Однако практически полная блокада эффектов фабомотизола антагонистом Sigma1R в данной модели свидетельствует о более значительном вкладе шаперона в нейропротекторное действие препарата.

Проведённый в диссертации анализ вновь выявленных фармакодинамических свойств фабомотизола и известных данных о патогенетических звеньях нейродегенеративных заболеваний и депрессивных расстройств дал основание сформулировать рекомендации о расширении показаний к применению фабомотизола для лечения заболеваний, сопровождающихся тревожно-депрессивными симптомами и нейродегенеративными проявлениями. Таким образом, практические рекомендации в Заключении диссертации являются вполне обоснованными.

Таким образом, выводы и научные положения диссертации логично вытекают из результатов работы, соответствуют цели и задачам исследования. Всесторонний анализ поставленной в работе научной проблемы, большой объём экспериментальных данных, полученных современными методами

исследования в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют об обоснованности сформулированных в диссертации научных положений, выводов и практических рекомендаций.

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

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций обусловлена достаточным объёмом экспериментальных выборок, корректным применением адекватных задач исследования и экспериментальным моделям методов математической обработки и статистического анализа.

Научная новизна диссертационной работы Воронина М.В. заключается в установлении фармакологически значимых мишеней фабототизола: Sigma1R шаперон, хинонредуктаза 2 (NQO2) и моноаминоксидаза-A (MAO-A). Установлено, что фабототизол ингибирует ферменты NQO2 и MAO-A и является агонистом шаперона Sigma1R. С применением селективных антагонистов доказана зависимость анксиолитического эффекта фабототизола от Sigma1R. В *in vivo* модели болезни Паркинсона доказаны нейропротекторные свойства фабототизола при курсовом профилактическом и терапевтическом применении. В *in vitro* моделях окислительного повреждения на разных типах клеток и модели болезни Паркинсона с использованием фармакологических анализаторов выявлен вклад Sigma1R и NQO2 в цитопротекторный и нейропротекторный эффекты фабототизола.

### **Теоретическая и практическая значимость результатов работы**

Теоретическая значимость исследования заключается в выявлении новых механизмов действия оригинального препарата фабототизола. Этот результат позволяет обосновать возможность достижения широкого спектра нейротропных эффектов за счёт активации шаперонной функции. Установлено, что ингибирующее влияние фабототизола на NQO2 способствует защите клеток от окислительного повреждения, опосредованного хинонными соединениями. Показан синергизм активации

шаперона Sigma1R и ингибирования фермента NQO2 для достижения нейропротекторного действия.

Практическая значимость работы определяется расширением показаний фабомотизола к применению для профилактики и лечения распространённых заболеваний ЦНС, патогенез которых включает нарушения упаковки белков и обмена катехоламинов. Выявленные в работе фармакологическая активация Sigma1R шаперона и ингибирование NQO2 дают основание для разработки подходов к адъювантной фармакотерапии тревожно-депрессивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний. Установление фармакологических мишеней фабомотизола и эффектов их регуляции в моделях неврологических заболеваний создаёт научный задел для дальнейшего поиска соединений-кандидатов для разработки эффективных средств фармакотерапии заболеваний ЦНС.

#### **Общая характеристика работы. Оценка содержания работы, её завершенности и оформления**

Диссертация Воронина М.В. изложена на 225 страницах, содержит 18 таблиц и 45 рисунков. Структура диссертации включает введение, основную часть, заключение, перечень сокращений и условных обозначений, список литературы. Основная часть диссертации состоит из обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения. Введение содержит обоснование актуальности темы, постановку цели исследования, выносимые на защиту положения диссертации. Для достижения цели диссертационного исследования сформулировано 7 научных задач. Степень разработанности темы исследования представлена на основании широкого спектра научно-исследовательских работ по изучению фармакологической активности фабомотизола, выполненных в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Введение содержит чёткую аргументацию новизны, теоретической и практической значимости, степени достоверности, методологии исследования. Приведены исчерпывающие

сведения об апробации материалов диссертационного исследования, личном вкладе автора, публикациях по теме исследования.

В обзоре литературы М.В. Воронин тщательно проанализировал историю открытия, экспрессию генов, структуру белков и активных центров, внутриклеточную локализацию и физиологическую роль лиганд-зависимого шаперона Sigma1R и фермента хинонредуктазы 2 (NQO2), что позволило обосновать схему выполнения дальнейших экспериментов.

В главе «Материалы и методы» охарактеризованы экспериментальные животные и условия их содержания, перечислены применяемые реактивы. Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием разнообразных молекулярных, клеточных и поведенческих методик. Глава содержит описание *in vitro* и *in vivo* методик с необходимыми ссылками на научную литературу. Для *in vivo* экспериментов приведены характеристики контрольных и опытных групп, даётся указание на положительные заключения комиссии по биоэтике и соответствие экспериментов концепции 3R. Для каждого этапа исследования даны методы обработки экспериментальных данных и критерии их статистического анализа.

Изложение результатов работы подразделяется на три основных блока: *in vitro* изучение аффинности фабомотизола к кандидатным рецепторным белкам; *in vitro* изучение влияния фабомотизола на функциональную активность ферментов MAO-A, NQO2 и Sigma1R шаперона; *in vitro* и *in vivo* изучение роли NQO2 и Sigma1R в анксиолитическом, цитопротекторном и нейропротекторном эффектах фабомотизола. Результаты изложены очень убедительно. Статистический анализ данных проведен безупречно в соответствии с современными стандартами. Описание экспериментальных данных исчерпывающе дополняется ссылками на публикации в рекомендованных ВАК рецензируемых научных журналах с указанием соавторов, таблицами, столбчатыми диаграммами, рисунками, которые сопровождаются детальными примечаниями.

В обсуждении результатов на основании сопоставления собственных данных и информации из научной периодики проанализирована роль шаперона Sigma1R и фермента NQO2 в фармакодинамике фабомотизола. На основании результатов молекулярного докинга и данных о функциональной активности известных лигандов Sigma1R даётся обоснование агонистических свойства фабомотизола по отношению к Sigma1R. Исходя из этого, рассматриваются шаперон-зависимые механизмы анксиолитического и нейропротекторного эффектов препарата. Даётся анализ современных научных данных о патогенезе нейродегенеративных заболеваний и роли нарушений метаболизма катехоламиновых нейромедиаторов в механизме окислительного стресса, что позволяет рассматривать ингибирование фабомотизолом NQO2 как новый перспективный подход 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 совершенствования фармакотерапии ряда нозологий с применением фабомотизола обоснованы и содержат ссылки на МКБ-11.

Список литературы включает 836 источников, из них 57 отечественных и 779 зарубежных. Большинство научных источников составляют публикации за последние 10-15 лет.

Работа характеризуется последовательным и понятным изложением научного материала и соответствует требованиям оформления докторской диссертации. Автореферат соответствует содержанию диссертации и отражает основные результаты исследования.

#### **Публикации по теме диссертации и апробация работы**

По материалам диссертации опубликовано 42 работы, в том числе 24 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Семь



научных статей опубликованы в высокорейтинговых зарубежных изданиях Q1-Q2 WoS JCR. Основные результаты работы представлены на съездах российских фармакологов и физиологов, отечественных и зарубежных научных конференциях и конгрессах.

### **Вопросы и замечания**

Принципиальных замечаний к диссертационной работе не имеется. В тексте присутствуют несколько технических погрешностей и опечаток. В процессе ознакомления с работой к диссертанту возник ряд вопросов:

1. Известно, что с Sigma1R взаимодействуют широко известные препараты, как галоперидол и кетамин. Есть ли у этих препаратов фармакологические эффекты, сходные с фабомотизолом?
2. Из литературных данных следует, что как Sigma1R, так и NQO2 локализованы внутриклеточно. Возникает вопрос о механизме проникновения фабомотизола внутрь клетки и возможности его метаболизма в M-11.
3. Известно, что основная функция шаперонов – восстановление нативной конформации внутриклеточных белков, нарушенной в результате негативных воздействий. Как можно объяснить роль шаперонов в остром противотревожном эффекте препарата на здоровых животных?
4. По современным представлениям в патогенезе многих психических и нейродегенеративных расстройств важную роль играет нейровоспаление. Могут ли обнаруженные в работе механизмы определять противовоспалительное действие фабомотизола?

### **Заключение**

Актуальность темы исследования, научная новизна, научно-практическая значимость полученных результатов позволяют заключить, что диссертация Воронина Михаила Владимировича «Молекулярные механизмы фармакологических эффектов фабомотизола» является законченным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы

выявления молекулярных механизмов фармакологических эффектов оригинального отечественного лекарственного средства фабомотизола, имеющей важное значение для фармакологии и клинической фармакологии. Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., № 650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г., №426 от 20.03.2021г., №1539 от 11.09.2021г., №1690 от 26.09.2022г., №101 от 26.01.2023г., № 62 от 25.01.2024г.), а её автор, Воронин Михаил Владимирович, заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Директор Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Научный центр психического здоровья»  
Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации,  
заведующий лабораторией нейроиммунологии  
доктор медицинских наук, профессор

Клюшник Т.П.

Подпись доктора медицинских наук, профессора  
Клюшник Татьяны Павловны заверяю  
Ученый  
секретарь \_\_\_\_\_



Бархатова А.Н.

«22» мая 2024г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Индекс, почтовый адрес места работы: 115522, Москва, Каширское шоссе, 34, Телефон: +7(916)119-73-78, E-mail: klushnik2004@mail.ru