

## ОТЗЫВ

официального оппонента, заслуженного деятеля науки РФ, академика РАН, доктора медицинских наук, профессора Спасова Александра Алексеевича 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**

Актуальность избранной темы диссертационного исследования обусловлена с одной стороны активным распространением тревожно-депрессивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний в условиях развития научно-технического прогресса и увеличения продолжительности жизни. А с другой – отсутствием достаточно эффективной патогенетической фармакотерапии, что не позволяет ограничить потерю трудоспособности и инвалидизацию, в трудоспособном возрасте препятствует активному долголетию. Диссертационная работа Воронина М.В. направлена на изучение молекулярных механизмов действия оригинального отечественного лекарственного средства фабомотизола, обладающего анксиолитическим, нейропротекторным и антидепрессивным свойствами. Внедрение в медицинскую практику фабомотизола оказалось чрезвычайно актуальным для внегоспитального применения, поскольку препарат свободен от ряда недостатков бензодиазепиновых транквилизаторов или ингибиторов обратного захвата моноаминов (SSRI, SNRI). Имеются основания полагать, что молекулярный механизм действия фабомотизола комплементарен патогенетическим процессам при нейродегенеративных заболеваниях, что определяет перспективу разработки новых фармакологических подходов к их лечению. Таким образом, актуальность изучения молекулярных механизмов действия фабомотизола, проявившего в доклинических исследованиях и медицинской

практике уникальный спектр фармакологической активности, не вызывает сомнений.

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

Целью диссертационной работы Воронина М.В. явилось выявление первичных молекулярных мишеней фабомотизола и установление их вклада в формирование анксиолитического и нейропротекторного эффектов препарата. Для достижения цели сформулировано семь научных задач, которые успешно решены в ходе исследования. Цель, задачи и план исследования обоснованы во введении и литературном обзоре диссертации.

Выносимое на защиту положение 1 и вывод 1 отражают экспериментально доказанный факт того, что первичными мишенями действия фабомотизола с фармакологически значимыми параметрами связывания являются шаперон Sigma1R, ферменты хинон редуктаза 2 (NQO2), моноаминоксидаза-А (MAO-A). Положение 1 и вывод 1 диссертационного исследования обоснованы представленными в главе 2.3.1 результатами радиолигандного исследования взаимодействия фабомотизола с более чем 80 белковыми мишенями, отобранными на основании анализа сходства структуры молекулы фабомотизола и фармакологических свойств препарата с известными фармакофорными моделями лигандов рецепторов-кандидатов и эффектами, опосредуемыми их прототипными лигандами.

Положение 2 диссертации включает результаты изучения влияния фабомотизола на каталитическую активность выявленных ферментов-мишеней. Обратимое ингибирующее влияние фабомотизола на ферменты MAO-A и NQO2 убедительно доказано в *in vitro* биохимических исследованиях (главы 2.3.2.1 и 2.3.2.2) и отражено в выводах 2 и 3. На образцах головного мозга крыс выявлено соответствие ингибирующей активности фабомотизола в отношении MAO-A митохондрий и лигандного взаимодействия афобазола с активным центром фермента. Обратимость

ингибирования фабототизолом MAO-A установлена в условиях преинкубации и отмывки митохондрий печени крыс. Отражённый в выводе 3 обратимый смешанный тип ингибирования фабототизолом рекомбинантного NQO2 человека обоснован представлением экспериментальных данных в классических координатах Лайнуивера – Берка.

Положение 3 и вывод 4 диссертации содержат доказательство агонистического влияния фабототизола на лиганд-зависимый шаперон Sigma1R. Методом флюоресцентной микроскопии на культуре клеток гиппокампа мыши HT-22 показано вызванное фабототизолом внутриклеточное перераспределение Sigma1R в область внешней мембраны нейронов и аксоны. Маркерное значение внутриклеточной транслокации шаперона для активности агонистов Sigma1R обосновано в главе 2.1.1.7 обзора литературы с указанием необходимых ссылок на источники. Способность фабототизола вызывать транслокацию Sigma1R *in vitro* подтверждается данными *ex vivo* радиолигандного анализа связывания прототипного лиганда Sigma1R (+)-пентазоцина в мембранных фракциях гомогенатов головного мозга мышей.

Положение 4 и вывод 5 диссертации посвящены доказательству вклада шаперона Sigma1R в анксиолитический эффект фабототизола. Обоснованность положения 4 и вывода 5 определяется использованием адекватной экспериментальной модели и стандартных селективных антагонистов Sigma1R. На репрезентативной выборке мышей BALB/c, характеризующихся реакцией замирания в новой обстановке, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» установлено, что антагонисты Sigma1R препятствуют анксиолитическому действию фабототизола. Продемонстрированное в главе 2.3.3 вызванное фабототизолом увеличение активности в открытых рукавах теста блокировали предварительно вводимые антагонисты Sigma1R, не снижая число заходов в закрытые рукава. Полученные результаты согласуются с выявленными в лаборатории

фармакогенетики НИИ фармакологии имени В.В. Закусова способностью фабомотизола препятствовать стресс-индуцированному снижению специфического связывания бензодиазепинов ГАМК<sub>A</sub> рецепторным комплексом и вовлечённостью Sigma1R в эффекты, обусловленные положительной аллостерической модуляцией ГАМК<sub>A</sub> рецептора.

Положение 5 вытекает из выводов 6, 7 и 8 диссертации, отражающих доказательства роли комплексного взаимодействия фабомотизола с шапероном Sigma1R и ферментом NQO2 в механизме цитопротекторного и нейропротекторного эффектов препарата. Выбор экспериментальных моделей обоснован в обзоре литературы и обсуждении результатов исследования. Вывод 6 свидетельствует о цитопротекторном действии фабомотизола, которое доказано с применением оригинального методического подхода, основанного на оцениваемом методом ДНК-комет повреждении макромолекул в *in vitro* моделях окислительного стресса, вызванного эндогенными и экзогенными хинонами (главы 2.3.4 и 2.3.6). Выявление в экспериментах *in vitro* вклада Sigma1R и NQO2 в цитопротекторный эффект фабомотизола с использованием селективных лигандов, позволило перейти к изучению роли этих малоизученных мишеней фабомотизола в *in vivo* модели болезни Паркинсона, патогенез которой включает нарушения упаковки белков и обмена катехоламинов с образованием их хинонных производных, гиперпродукцию активных форм кислорода.

Вывод 7 отражает доказательство нейропротекторного действия фабомотизола в валидированной модели болезни Паркинсона с использованием интратриатного юнилатерального введения 6-гидроксидофамина (6-OHDA) лабораторным мышам. Обоснованность вывода 7 базируется на согласованных данных о восстанавливающем действии профилактического и терапевтического двухнедельного введения фабомотизола на содержание дофамина в повреждённом стриатуме и уровень тирозингидроксилазы в ипсилатеральной чёрной субстанции

мышей, нормализации двигательной активности опытных животных в двух вариантах теста «вращающийся стержень». Вывод 8 в части, касающейся вклада шаперона Sigma1R в нейропротекторную активность фабомотизола, обоснован установленной в главе 2.3.5 способностью селективных антагонистов Sigma1R препятствовать нейропротекторному действию препарата, эффекты которого оказались сходны с влиянием стандартного агониста Sigma1R. Вклад фермента NQO2 в противопаркинсоническое действие афобазола обоснован выявленной в главе 2.3.7 более высокой эффективностью афобазола в сравнении со сходным по структуре метаболитом M-11, для которого в главах 2.3.1 и 2.3.2 продемонстрировано избирательное взаимодействие с регуляторным сайтом NQO2 (MT<sub>3</sub> рецептор) и ингибирующее влияние на ферментативную активность NQO2.

Сопоставление данных о фармакодинамике фабомотизола и патогенезе нейродегенеративных заболеваний, отражённое в обсуждении результатов исследования, позволило сформулировать вывод 9 о необходимости расширения показаний к применению фабомотизола для лечения ряда заболеваний ЦНС. Практические рекомендации убедительно обоснованы в главе 3.2. Заключение с использованием собственных экспериментальных данных, публикаций научного коллектива лаборатории фармакогенетики, в том числе с участием зарубежных исследователей, и современных данных мировой научной периодики.

Таким образом, научные положения, выносимые на защиту, и выводы диссертационного исследования логично вытекают из полученных результатов, соответствуют цели и задачам исследования. Глубокая теоретическая проработка научной проблемы, достаточный объём экспериментального материала, использование современных методов исследования и валидированных экспериментальных моделей свидетельствуют об обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации.

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

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется включением в эксперимент репрезентативных рандомизированных экспериментальных выборок контрольных и опытных групп, использованием валидных, в том числе высокоточных, методов исследования, применением адекватных критериев оценки типа распределения первичных экспериментальных данных, параметрических и непараметрических критериев статистического анализа с поправками на множественное сравнение. План экспериментов включал получение данных от интактных животных и все необходимые контрольные группы.

Научная новизна диссертационного исследования Воронина М.В. заключается в выявлении ранее неизвестных молекулярных механизмов действия отечественного оригинального лекарственного средства фабомотизола, сочетающего анксиолитические, антидепрессивные и нейропротекторные свойства. Согласно предложенному алгоритму радиолигандного анализа выявлены белковые мишени фабомотизола с фармакологически значимыми параметрами связывания – лиганд-зависимый Sigma1R шаперон, ферменты хинонредуктаза 2 (NQO2) и моноаминоксидаза-А (MAO-A). В биохимических исследованиях доказано ингибирующее влияние фабомотизола на NQO2 и MAO-A. В экспериментах *in vitro* установлены агонистические свойства фабомотизола в отношении Sigma1R. С применением стандартных антагонистов доказана зависимость анксиолитического эффекта фабомотизола от Sigma1R. В *in vitro* моделях окислительного повреждения установлено участие шаперона Sigma1R в цитопротекторном действии фабомотизола. На экспериментальной модели болезни Паркинсона доказаны нейропротекторные свойства фабомотизола в условиях как профилактического, так и терапевтического введения.

С применением селективных анализаторов установлена зависимость противопаркинсонических эффектов препарата от взаимодействия с шапероном Sigma1R. С использованием селективного лиганда регуляторного сайта NQO2 (MT<sub>3</sub> рецептор) в *in vitro* моделях окислительного стресса показано участие NQO2 в цитопротекторном действии фабомотизола. В *in vivo* модели болезни Паркинсона впервые продемонстрирована роль NQO2 в формировании нейропротекторного эффекта. Доказана однонаправленность нейротропных эффектов фабомотизола, опосредуемых активацией шаперона Sigma1R и ингибированием NQO2.

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

Теоретическая значимость диссертационной работы обусловлена раскрытием механизмов фармакодинамики оригинального препарата фабомотизола, что позволило обосновать возможность достижения широкого спектра нейротропных эффектов за счёт активации белков-шаперонов. Установлено, что ингибирование фабомотизолом NQO2 обеспечивает защиту клеток от окислительного стресса, опосредованного соединениями хинонной природы. Продемонстрирована синергичность активации шаперона Sigma1R и ингибирования фермента NQO2 в достижении нейропротекторного действия.

Практическая значимость работы следует из установленных молекулярных механизмов действия фабомотизола и заключается в расширении показаний препарата для профилактики и лечения распространённых нейродегенеративных заболеваний и тревожно-депрессивных расстройств. Доказательство фармакологической активации Sigma1R шаперона открывает перспективу их адьювантной фармакотерапии. Выявление фармакологических мишеней фабомотизола и способов их регуляции в моделях заболеваний ЦНС создаёт научный базис для поиска оригинальных нейротропных средств.

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

Диссертационная работа Воронина М.В. изложена на 225 страницах, включает 45 рисунков и 18 таблиц. Рукопись содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования и их обсуждение, заключение, перечень сокращений и условных обозначений, список литературы.

Во Введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи работы, положения, выносимые на защиту. Детально изложена разработанность темы исследования, аргументированно представлены новизна, теоретическая и практическая значимость, исчерпывающе отражены степень достоверности и сведения об апробации диссертационного исследования.

Изложение материала в Обзоре литературы сосредоточено на всесторонней биохимической и физиологической характеристике двух новых белковых мишеней фабомотизола, к которым препарат проявил наибольшее сродство в скрининговых исследованиях – шаперону SignalR и хинонредуктазе 2. На основании анализа современных научных источников для указанных белков приведены данные об экспрессии в органах и тканях *Homo sapiens* и *Mus musculus*, структуре белка и активного центра, охарактеризованы стандартные лиганды SignalR, субстраты, кофакторы и ингибиторы NQO2, детально рассмотрены известные данные об их функциональной активности. Обзор литературы заключают резюме и описание дизайна исследования.

Раздел Материалы и методы включает характеристики условий содержания экспериментальных животных, контрольных и опытных групп. Автор отмечает, что все манипуляции с лабораторными животными соответствовали правилам 3R и одобрены комиссией по биоэтике. Раздел содержит перечень используемых реактивов и подробное изложение



методик *in vitro* и *in vivo* исследований. В разделе приведены алгоритмы обсчёта экспериментальных данных, даётся обоснование применения критериев статистической обработки.

Результаты работы изложены в соответствии с планом исследования и включают изучение аффинности фабомотизола к кандидатным рецепторным белкам, изучение влияния препарата на активность MAO-A, NQO2 и Sigma1R, изучение вклада NQO2 и Sigma1R в анксиолитический, цитопротекторный и нейропротекторный эффекты фабомотизола. Представление собственных результатов содержит достаточное количество рисунков, диаграмм и таблиц. Для графического представления автором грамотно использованы описательные статистики. Примечания к рисункам и таблицам содержат исчерпывающую информацию об использованных обозначениях, размере экспериментальных выборок, применяемых статистических критериях. Важно отметить, что все результаты диссертационного исследования содержат ссылки на публикации в рекомендованных ВАК научных журналах с указанием соавторов.

Обсуждение результатов включает анализ выявленного вклада шаперона Sigma1R и фермента NQO2 в фармакологические эффекты фабомотизола. С привлечением большого количества литературных данных о функциональной активности и лигандной регуляции шаперона Sigma1R в обсуждении аргументировано доказывается агонистическое влияние фабомотизола на Sigma1R, раскрываются возможные зависимые от Sigma1R механизмы анксиолитического и нейропротекторного эффектов фабомотизола. Сопоставление выявленных в диссертационном исследовании способности фабомотизола ингибировать NQO2, вклада фермента в цитопротекторный и нейропротекторный эффекты препарата с данными публикаций о нарушении метаболизма катехоламинов, изменениях экспрессии и активности фермента в патогенезе нейродегенеративных заболеваний даёт основания рассматривать ингибирование NQO2 как новый механизм защиты клеток нервной системы от окислительного стресса.

В Заключении представлены выводы исследования и патогенетическое обоснование расширения показаний к применению фабомотизола, на базе которого сформулированы практические рекомендации. Девять выводов логично следуют из содержания диссертации, соответствуют задачам исследования и положениям, выносимым на защиту.

Библиография диссертационного исследования включает 836 источников, из них 57 отечественных и 779 зарубежных. Основная часть источников представлена журнальными публикациями за последние 15 лет.

Диссертация имеет классическую структуру, написана хорошим научным языком и удовлетворяет требованиям оформления докторской диссертации. Автореферат соответствует содержанию диссертации и в достаточной степени 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. Основные результаты работы доложены на международных конгрессах, съездах российских фармакологов и физиологов, отечественных и зарубежных научных конференциях.

#### **Вопросы и замечания**

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Исследование выполнено на высокотехнологическом уровне с использованием стандартных и современных методов исследований, хорошо статистически обработано, текст легко читается. Выводы логически соответствуют результатам исследований. Вместе с тем хотелось бы услышать ответы на некоторые вопросы, имеющие уточняющий характер:

1. Почему в работе, особенно на первом этапе, не используются биоинформационные методы для определения возможных мишеней нейрорепродуктивного действия препарата фабомотизола?

2. Пытались ли вы продокировать препарат фабомотизол в активные центры предполагаемых мишени и какова была энергия связывания?

3. В исследованиях, проводимых *in vitro*, очень часто возникает интерференция действующего соединения с растворителями, солибилизаторами и т.д. Как часто она встречалась у вас и как вы её выявляли?

Заданные вопросы ни коем образом не умаляют высокий уровень полученных данных и используемых технологий и носят уточняющий характер.

### **Заключение**

Диссертация Воронина Михаила Владимировича «Молекулярные механизмы фармакологических эффектов фабомотизола» является законченным трудом, в котором разработаны теоретические положения, позволившие раскрыть молекулярные механизмы фармакологических эффектов фабомотизола, совокупность которых можно квалифицировать как крупное достижение в развитии перспективного направления фармакологии и клинической фармакологии.

По научной новизне, актуальности, объему, качеству и методологическому уровню выполненных исследований, публикациям диссертационная работа полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (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.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор, Воронин Михаил Владимирович, заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики  
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,  
доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН,  
Заслуженный деятель науки РФ



Спасов А.А.

Подпись Спасова Александра Алексеевича заверяю:

Ученый секретарь  
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,  
доцент кафедры общественного здоровья  
и здравоохранения Института ИМФО,  
кандидат медицинских наук, доцент



Емельянова О.С.

« 21 » мая 2024г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Адрес: 400131, г. Волгоград, площадь Павших борцов, д.1,  
Тел.: +7(8442)40-30-02  
E-mail: pharmchair@mail.ru