

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Звартау Эдвина Эдуардовича на диссертационную работу Титович Ирины Александровны «Антигипоксическая и ноотропная активность янтарной соли fumarового эфира диэтиламиноэтанола», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность избранной темы

Национальный проект «Здравоохранение» в числе важнейших задач развития отечественной системы охраны здоровья рассматривает снижение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний и повышение качества и доступности помощи больным с сердечно-сосудистыми заболеваниями, начиная от профилактики, включая популяционную, развитие здорового образа жизни и индивидуальную профилактику.

Цереброваскулярные заболевания - проблема международного уровня. Острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) являются ведущей причиной смертности и инвалидизации. Ежегодно в мире регистрируют около 10 миллионов случаев инсульта, из которых на долю РФ приходится более 450 тысяч, причем 70-85% ишемической природы. Смертность от инсульта в нашей стране составляет 1,23 на 1000 населения, а в течение года после перенесённого инсульта умирает около 50 % больных.

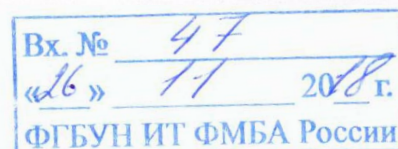
Хроническая недостаточность мозгового кровообращения (ХНМК) является одним из наиболее распространенных патологических состояний, особенно в пожилом возрасте. Число пациентов с явлениями хронической ишемии головного мозга в нашей стране неуклонно растет, составляя не менее 700 на 100000 населения (Суслина, Румянцева, 2009). Полагают, что ХНМК развиваются у 10% лиц старше 60 лет (Захаров, 2016). Наиболее серьезные медико-социальные последствия ХНМК связаны с прогрессивным ухудшением когнитивных функций и развитием деменции («сосудистая деменция»), которая является второй причиной этой патологии после нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера.

С учетом вышеуказанного работа, которая направлена на изучение любых биомедицинских аспектов, связанных с ОНМК или ХНМК, а тем более с изысканием и изучением новых средств их фармакотерапии является высокоактуальной.

Целью рецензируемой работы явилось изучение антигипоксической и ноотропной активности нового производного аминокетанола - янтарной соли fumarового эфира диэтиламиноэтанола или, в соответствии с систематическим названием, бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата (ФДЭС) при гипоксически-ишемических повреждениях мозга. Для достижения поставленной цели было проведено изучение антигипоксической активности ФДЭС на моделях острых нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии, длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии, экспериментальной ишемии головного мозга и выявление ноотропной активности в тестах оценки когнитивных функций у лабораторных животных.

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

Диссертационная работа включает 4 раздела. Первый посвящен влиянию ФДЭС на переносимость мышцами острой гипоксии, второй – эффекту ФДЭС в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии. Третий и четвертый разделы содержат



результаты изучения нейропротекторной активности ФДЭС в условиях экспериментальной ишемии головного мозга и влияние ФДЭС на когнитивные функции, соответственно.

Автором вынесены на защиту четыре положения, а результаты проведенного исследования суммированы в четырех выводах. *Положение 1 и вывод 1* касаются способности ФДЭС оказывать антигипоксический эффект на моделях острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии в широком диапазоне доз с наиболее выраженным действием в дозах 10 и 75 мг/кг.

В пользу заявленного положения 1 свидетельствует тот факт, что ФДЭС проявлял антигипоксический эффект в широком диапазоне доз, что выражалось понижением концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе при которой наступала гибель животных. Эффект не имел определенной зависимости от дозы.

Антигипоксическая активность ФДЭС была сопоставима с таковой препарата сравнения амтизола в минимальной дозе 25 мг/кг (уровень усредненной активности 0,94 «амтизоловых единицы»). Другой референсный препарат, цитофлавин, не был активен на модели острой нормобарической гипоксии, что, по мнению автора, указывает на отсутствие сукцинатного компонента в механизме антигипоксического действия ФДЭС.

На модели острой гемической гипоксии амтизол был эффективен, т.е. увеличивал время жизни в 1,5 раза (контрольные животные погибали через 16 мин) в дозе 50 мг/кг. ФДЭС (75 мг/кг) превышал максимум эффекта амтизола, причем, в отличие от нормобарической гипоксии, на модели гемической гипоксии отмечена дозо-зависимость.

В опытах с острой гистотоксической гипоксией амтизол в обеих исследованных дозах (25 и 50 мг/кг) удлинял срок жизни мышей после введения токсической дозы ингибитора тканевого дыхания нитропруссид натрия. ФДЭС исследовали в 4 дозах (10-25-50-75 мг/кг) и наблюдали сравнимый с эффектом амтизола антигипоксический эффект при «умеренной» дозо-зависимости. С учетом того, что высшая исследованная доза цитофлавина более, чем в 2 раза повышала устойчивость мышей к острой гистотоксической гипоксии, автор предполагает вклад в это действие янтарной кислоты, входящей в молекулу ФДЭС.

Положение 2 и вывод 2 основаны на результатах, изложенных в разделе 3.2, и указывают на то, что ФДЭС (исследованы дозы 10 и 75 мг/кг) проявляет защитное действие в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии (ДИНГ), улучшая нарушенное ориентировочно-исследовательское поведение, снижая эмоциональную лабильность и агрессивность. В условиях хронического гипоксического стресса под действием препарата уменьшается выраженность лактоацидоза, оксидативного стресса, активируется эритропоэз.

Данное положение и вывод базируются на достаточно убедительном экспериментальном материале по основному препарату ФДЭС и препаратам сравнения - цитиколин (500 мг/кг), цитофлавин (130 мг/кг) и холина альфосцерат (100 мг/кг).

Изменение поведения в «открытом поле» и реакции на хендлинг (снижение общей и поисковой активности, повышение эмоциональной лабильности и агрессивности) расценены автором как следствие ДИНГ. Защитный эффект ФДЭС проявлялся в дозе 10 мг/кг. Наиболее сбалансированным, т.е. затрагивающим все регистрируемые показатели, был умеренный по выраженности эффект цитиколина.

Общность защитного действия ФДЭС, цитиколина и холина альфосцерата дала автору основание предполагать вклад холинергического механизма в фармакодинамику ФДЭС.

На модели приподнятого крестообразного лабиринта ДИНГ вызывала изменения, которые интерпретируются как повышение тревожности. Курсовое применение ФДЭС в оптимальной дозе (10 мг/кг) замедляло формирование и снижало выраженность тревожных, невротических (астенических) проявлений и частично поддерживало ориентировочно-

исследовательскую деятельность животных. Эти эффекты расцениваются автором как связанные с антигипоксическим, нейропротекторным и ноотропным действием препарата.

ДИНГ приводила к изменению биохимических показателей, отражающих состояние стресса и гипоксии (повышение гликемии и уровня лактата). Исследованные препараты, включая ФДЭС, не снижали гликемию, что автор связывает с возможной активацией гликолитического пути образования макроэргических соединений. Лактатемия уменьшалась после меньшей (10 мг/кг) и возрастала после большей (75 мг/кг) дозы ФДЭС, что, по мнению автора, указывает на усиление гликолитического ресинтеза АТФ, особенно в сочетании с гипергликемической реакцией.

ДИНГ способствовала повышению на 44% активности каталазы в ткани мозга и снижению на 20% активности глутатионпероксидазы, что интерпретируется как признак активации перекисного окисления липидов, вызванного гипоксическим стрессом и истощение резервов глутатионового звена антиоксидантной системы. ФДЭС не влиял на активность каталазы, но дозозависимо активировал глутатионпероксидазу. Показатели гемограммы указывали на активацию эритропоэза.

Положение 3 и вывод 3 обоснованы экспериментальными данными, представленными в разделе 3.3 и полученными на модели перевязки общих сонных артерий. ФДЭС способствовал повышению выживаемости животных, снижению неврологического дефицита, выражающегося в улучшении координации движений и ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «Открытое поле».

Перевязка сонных артерий приводила к потере 2/3 животных к 3-недельному сроку эксперимента. В опытах с ФДЭС намечалась тенденция к повышению выживаемости. Вместе с тем, выраженность эффекта не позволяет с определенностью утверждать наличие защитного эффекта по показателю выживаемости. Более значимо выглядит защитный эффект по восстановлению координации движений в тесте «вращающийся стержень» и по поведенческим параметрам в тесте «открытое поле».

Положение 4 и вывод 4 сформулированы на основе результатов экспериментов с использованием тестов «Экстраполяционное избавление» и «Т-Лабиринт», в которых ФДЭС способствовал сохранению и воспроизведению полученной информации, а также оказывал антиамнестический эффект в тесте «УРПИ».

ФДЭС способствовал восстановлению УРПИ, нарушенной введением скополамина, на уровне, сравнимом с эффектом препарата сравнения пирацетама.

В тесте ЭПИ ФДЭС и пирацетам в обеих дозах способствовали более быстрому и качественному решению экстраполяционной задачи, причем ФДЭС имел также растормаживающее действие и укорачивал латентный период реакции в меньшей дозе.

На модели обучения в Т-образном лабиринте ФДЭС способствовал сохранению выученного поведения у 50% животных на 10-й день после окончания обучения. Примечательно, что в этот же срок эффект эталонного препарата пирацетам не наблюдался.

Таким образом, ФДЭС в обеих исследованных дозах существенно повышал эффективность обучения, запоминания и воспроизведения информации у животных, что рассматривается автором как подтверждение установленного в тестах УРПИ, ЭПИ и Т-лабиринта ноотропного действия этого соединения.

В целом, обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений.

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

Полученные в диссертационном исследовании результаты можно оценить как *достоверные*. Основанием для данной оценки является продуманный дизайн работы, достаточный объем материала, современный методический уровень (поведенческие, биохимические методы), современный статистический аппарат для анализа результатов.

Работа характеризуется рядом *новых фактов, научных положений, выводов и рекомендаций*. Автором экспериментально доказано выраженное не-дозозависимое (в диапазоне доз 10-800 мг/кг) антигипоксическое действие на моделях острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии в низком диапазоне доз, превосходящим таковое у препаратов сравнения.

Разработана новая модель длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии, (ДИНГ), ведущей к развитию поведенческого симптомокомплекса (снижение двигательной и исследовательской активности, повышение эмоциональности и агрессивности), а также к биохимическим изменениям (гиперлактатемия, гипергликемия, пониженная активность глутатионпероксидазы). На данной модели показано профилактическое экспериментально-терапевтическое действие препарата ФДЭС.

Оригинальной является демонстрация того, что в условиях ишемии, вызванной двусторонней перевязкой общих сонных артерий, ФДЭС снижал смертность, минимизировал изменения поведения в «открытом поле» и нарушения координации движений. Новым является экспериментальное доказательство антиамнестической активности ФДЭС, сравнимой с эффектом препарата сравнения пираретама.

Научно-практическая ценность результатов работы

Существенная теоретическая ценность работы состоит в разработке и валидации модели длительной интерметтирующей гипоксии.

Практическая ценность состоит в фармакологическом изучении соединения ФДЭС в объеме, достаточном для принятия решения о дальнейшей разработке препарата для лечения ишемических заболеваний головного мозга. Кроме того, представляется перспективной дальнейшая фармакологическая разработка этого ряда соединений с целью изыскания оригинальных препаратов ноотропного профиля.

Общая характеристика работы. Оценка содержания работы, ее завершенности и оформления.

Работа составлена по ясно сформулированному плану, основанному на анализе состояния проблемы, определении перспективного направления исследования, четкой формулировке цели и задач и разработке оптимального дизайна исследования.

Диссертация изложена на 165 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы, включает 277 источников, в том числе 76 отечественных и 201 иностранных авторов. Восприятие материала облегчают 21 рисунок и 21 таблица.

Во *введении* автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну, степень разработанности проблемы, практическую значимость, степень достоверности полученных результатов, собственный вклад в работу.

В детальном, на 39 страницах, обзоре литературы (*глава 1*) автор анализирует механизмы повреждения нейронов при гипоксически-ишемических нарушениях и способы их фармакологической коррекции. Рассмотрены основные этапы гипоксически-ишемического повреждения головного мозга и механизмы антиоксидантной защиты. Дана обстоятельная характеристика различных групп терапевтических средств, в том числе производных аминокетанола, сукцинатсодержащих антигипоксантов; суммированы данные о

рецепторных механизмах действия сукцината. Обзор хорошо построен методически и отражает достаточную ориентированность автора в проблеме.

В главе 2 дана характеристика исследованного вещества бис{2-[(2E)-4- гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат (2:1) (ФДЭС), а также референсных препаратов 1,2,4-тиадиазол-3,5-диамина (амтизол), сукцинилсодержащего антигипоксанта цитофлавина, препарата, цитиколин, содержащего комплекс из цитидина и холина, препарата холина альфосцерат, обладающего центральным холиномиметическим действием, и эталонного ноотропа пирацетама.

Приведены сведения об экспериментальных животных, условиях их содержания, распределения по методам исследования и по экспериментальным моделям, методики расчета основных показателей.

В соответствующих подразделах главы 2 подробно описаны методы изучения гипоксически-ишемических состояний, использованные в диссертации, в частности, моделирование кратковременной гипоксии, модели острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии, протокол длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии, модель перевязки общих сонных артерий, а также поведенческие методы («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «вращающийся стержень», условный рефлекс пассивного избегания, тест «экстраполяционное избавление» (ЭПИ), Т-образный лабиринт.

Суммированы показатели биохимических исследований крови, ткани мозга, определение активности глутатионпероксидазы, каталазы, концентрации белка.

В отдельном подразделе главы рассмотрены данные о статистической обработке и использованных критериях значимости.

Глава 3 содержит описание основных результатов проведенного исследования. В подразделах главы последовательно представлены результаты опытов по влиянию ФДЭС на переносимость мышами острой гипоксии, фармакологической активности ФДЭС в условиях длительной интермиттирующей нормобарической гипоксии, изучению нейропротекторной активности ФДЭС в условиях экспериментальной ишемии головного мозга, влиянию ФДЭС на когнитивные функции.

Материал представлен лаконично и конкретно. Таблицы и рисунки повышают наглядность изложения.

В заключении подводятся итоги выполненных исследований, приведены *выводы и практические рекомендации*.

Публикация результатов

Материалы диссертации опубликованы в 14 научных работах, в том числе 3 статьях в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, имеется патент на изобретение, характеризующий нейропротекторное действие соединения ФДЭС.

Автореферат и опубликованные работы в достаточной степени отражают основные положения диссертации.

Замечания и вопросы

Работа написана хорошим языком, легко читается. При внимательном прочтении текста диссертации выявлено незначительное число стилистических погрешностей: непривычные термины типы «фосфорилируюясь» (стр. 33, строка 13 снизу), «.....содержание кислорода..... устанавливалась и регулировалась.....» (стр. 61, строка 10 сверху). Изредка попадаются ошибки, например, слово «поглАщение» стр. 72, строка 12 снизу, словосочетание «достроенные отличия» в сноске к таблицам 7 и 20.

