

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Звартау Эдвина Эдуардовича на диссертационную работу Колбасова Кирилла Сергеевича на тему «Экспериментальное обоснование комплексного лекарственного средства для ингаляционного применения при поражениях, вызванных пульмонотоксикантами», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.04 – токсикология и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность избранной темы

Средства массовой информации и специализированные источники ежегодно сообщают о десятках промышленных, транспортных аварий и техногенных катастроф в разных странах мира. К этому следует добавить постоянно растущую опасность террористических угроз. Одной из групп наиболее аварийно опасных химических веществ являются высокотоксичные пульмонотоксиканты (в частности, аммиак, хлор, фосген), способные вызвать массовые поражения персонала химически опасных промышленных, прочих объектов и населения при чрезвычайных ситуациях химической природы.

Пульмонотоксиканты характеризуются высокой токсичностью при остром отравлении с развитием бронхообструктивного синдрома, токсического отека легких и воспаления дыхательных путей и паренхимы легких. У выживших пораженных возможно развитие долгосрочных патологических процессов.

Поскольку специальных средств для ингаляционного введения с целью купирования поражений, вызванных пульмонотоксикантами, в настоящее время нет, разработку подобных препаратов следует оценить, как, безусловно, актуальную задачу.

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

Основные результаты диссертационной работы сформулированы в 4 положениях, вынесенных на защиту, 9 выводах и 4 научно-практических рекомендациях.

Положение №1 и выводы №№ 1 и 2 касаются валидации моделей острого ингаляционного воздействия пульмонотоксикантов, отбора лекарственных

| | |
|----------------------|------------|
| Вх. № | 31 |
| «02» | 09 2016 г. |
| ФГБУН ИТ ФМБА России | |

средств, имеющих терапевтическую перспективу при этих поражениях и доказательство их эффективности на моделях экспериментальной фармакотерапии острых ингаляционных поражений, вызванных аммиаком, хлором и фосгеном.

На основе анализа литературы в качестве эффективных средств купирования основных синдромов поражения пульмонотоксикантами (бронхообструктивного и отечного) для дальнейшего исследования на моделях экспериментальной фармакотерапии были избраны β_2 -адреномиметики фенотерол и сальбутамол, глюкокортикостероид преднизолон, миотропный спазмолитик аминофиллин и селективный Н-холинолитик с антиоксидантными свойствами педифен.

Положение №1 и выводы №№ 1 и 2 обоснованы результатами экспериментов, доказавших общность механизма токсического действия пульмонотоксикантов, терапевтическую эффективность аминофиллина (в/м), преднизолона (в/м), сальбутамола, фенотерола и педифена (ингаляционно) в терапевтических дозах для человека, адаптированных для лабораторных животных, при введении после затравки каждым из трех исследованных пульмонотоксикантов. Все исследованные препараты повышали выживаемость, отсрочивали время гибели животных, уменьшали основной показатель отека легких – их весовой коэффициент. Положительные эффекты отмечены также по вторичным показателям (стабилизация мембраны альвеолоцитов, активация детоксицирующей системы легких со снижением маркеров эндогенной токсемии, интенсивность потребления кислорода).

Соглашаясь с доказанностью терапевтического эффекта исследованных препаратов в целом, считаю дискуссионным формирование рядов лечебной эффективности исследованных препаратов, равно как и утверждение о различной эффективности при отравлениях разными токсикантами в силу отсутствия указаний на статистический инструмент, лежащий в основе построения подобных рядов.

Положение №2 и выводы №№3 и 4 основаны на результатах исследования терапевтической эффективности сочетаний исследованных препаратов. Доказано, что сочетанное ингаляционное применение сальбутамола и педифена не уступает

по лечебной эффективности *инъекционной* комбинации аминофиллина и преднизолона, а также сочетания преднизолона (в/м) и ингаляционного сальбутамола. Это наблюдение стало наиболее важным для последующих этапов разработки оригинального лекарственного средства «Сальбуфен».

Что касается превосходства комбинированной терапии по сравнению с монотерапией, то оно не подкреплено соответствующими расчетами и требует дополнительного анализа.

Наиболее важными в диссертации являются *положения №№ 3-4 и выводы №№ 5-8*, которые касаются основного достижения исследования – разработки оригинального лекарственного средства «Сальбуфен» в ингаляционной форме. Эффективность препарата на моделях экспериментальной фармакотерапии доказана на моделях острой интоксикации аммиаком, хлором, фосгеном, а также на модели хронических неспецифических заболеваний легких (ХНЗЛ). Применение препарата при острой интоксикации указанными ядами позволило увеличить в 2-3 раза выживаемость, снизить степень гидратации легких, выраженность обструктивного синдрома. На фоне действия препарата повышались антиоксидантные резервы легких, активность сурфактантов. Экспериментально-терапевтический эффект отмечен также на модели ХНЗЛ и проявлялся предупреждением бронхообтурации и воспалительных изменений в легких.

Безопасность препарата (*положение №4 и выводы №№7-8*) доказана адекватными методами токсикологии и позволила отнести препарат к IV классу токсичности.

Что касается *вывода 9* о том, что «разработанный комплексный препарат «Сальбуфен» является эффективным и безопасным перспективным лекарственным средством для лечения поражений пульмонотоксикантами и длительного лечения ХНЗЛ», то правильнее было бы формулировать его более осторожно, так как до проведения клинических исследований и подтверждения данных эксперимента делать такой вывод преждевременно.

Это же замечание следует сделать и применительно к рекомендациям автора №№ 2-3. До клинического подтверждения эффективности препарата «Сальбуфен» давать прямые рекомендации к клиническому использованию некорректно.

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

Основные и наиболее важные полученные в диссертационном исследовании результаты можно оценить как достоверные. Основанием для данной оценки является достаточный объем лабораторного материала, стандартизированный протокол исследования с рандомизацией животных по группам, наличие контроля, определение критериев оценки эффекта, использование стандартизированных и валидированных методов исследования.

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций заключается прежде всего в итоговом результате диссертационного исследования – разработке оригинального лекарственного средства «Сальбуфен» для ингаляционного применения при поражениях, вызванных пульмонотоксикантами и перспективой его регистрации как лекарственного препарата для медицинского применения.

Научно-практическая ценность результатов работы

Научная ценность результатов работы состоит в усовершенствовании и валидации экспериментальных моделей и маркеров поражений, вызванных эталонными пульмонотоксикантами и отработке алгоритма изыскания и изучения средств фармакотерапии вызванных ими поражений.

Практическая ценность работы состоит в разработке нового лекарственного средства для ингаляционного применения «Сальбуфен» на основе β_2 -адреномиметика сальбутамола и Н-холинолитика с дополнительными фармакологическими свойствами педифена.

Общая характеристика работы

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из введения, главы 1 с анализом литературных данных по токсичности пульмонотоксикантов и способам лечения ингаляционных поражений ими, главы 2, посвященной материалам и методам исследования, главы 3, описывающей моделирование острых ингаляционных поражений аммиаком, хлором и фосгеном, глав 4 и 5, характеризующих отбор перспективных лекарственных средств по их эффективности при моно- и комбинированной экспериментальной

фармакотерапии, обоснование рецептуры и характеристику препарата «Сальбуфен». Глава 6 суммирует данные по безопасности препарата «Сальбуфен». Диссертация завершается кратким заключением, выводами, практическими рекомендациями, списками сокращений и литературы. В качестве приложений даны проект Инструкции по медицинскому применению (ИМП) препарата «Сальбуфен» и стандарты оказания помощи пораженным аммиаком и хлором.

Во введении сформулированы актуальность темы, цель и задачи работы, научная новизна, научно-практическая значимость и внедрение результатов работы, положения, выносимые на защиту, апробация работы, публикации материалов исследования, личный вклад автора, обоснование достоверности полученных данных, структура и объем диссертации.

В подразделах главы 1 суммированы данные по физико-химическим свойствам, токсико-гигиеническим параметрам аммиака, хлора и фосгена и (в удобной табличной форме) сведения об авариях и техногенных катастрофах, связанных с применением аммиака и хлора (подраздел 1.1); охарактеризованы представления о патогенезе и данные о клинической картине отравлений пульмонотоксикантами (подраздел 1.2), патогенезу токсического отека легких (подраздел 1.3), лечению отравлений (подраздел 1.4) и их отдаленным последствиям (подраздел 1.5).

В целом текст литературного обзора занимает 39 страниц. Следует положительно оценить структуру главы, четкость плана изложения, практическое отсутствие ошибок в написании слов и пунктуации (во всей диссертации оппонент обнаружил только одну ошибку на стр.11, строка 6 снизу). Спорными, на взгляд оппонента, являются некоторые стилистические особенности текста, начиная с заглавия диссертации. Представляется, что правильнее было бы указать не на «... обоснование... лекарственного средства...», а на «...обоснование *разработки*... лекарственного средства...».

Полезная и интересная информация содержится в таблицах 1 и 2, но, что касается текста, смущает скорее справочный его характер, чем анализ литературы в разделах 1.1.1 (2 литературных ссылки вне таблицы 1), 1.1.2 (1 ссылка вне таблицы 2), 1.1.3 (2 ссылки). Аналогичное замечание касается раздела 1.2 (количество ссылок в

подразделах 1.2.1 – 0, 1.2.2 – 5, 1.2.3 – 2), раздела 1.3 (3 ссылки). Разделы 1.4 и 1.5 содержат полезные сведения о лечении отравлений и отдаленным последствиям отравлений пульмонотоксикантами со ссылками на отечественные и зарубежные литературные источники.

Глава 2 характеризует тест-систему (лабораторные животные и их содержание, раздел 2.1) и может быть оценена положительно. Все современные требования, определенными российскими и международными нормативными документами, в исследовании были учтены и соблюдались. Положительное впечатление оставляют методические и аппаратные средства для изучения острых ингаляционных поражений хлором, аммиаком и фосгеном (методы статической и динамической затравки, пылевые камеры с динамическим режимом, приемлемые способы контроля концентраций, а также метод прямого индивидуального дозирования, разработанный в Институте токсикологии). Набор методов и устройств, имевшихся в распоряжении автора, позволил адекватно решать поставленные задачи исследования.

Для моделирования хронических неспецифических заболеваний легких (ХНЗЛ, раздел 2.3) использовали модифицированный метод «запыления» животных в форме 4-часовых ежедневных сессий в течение 2 месяцев с параллельной сенсibilизацией (подкожное введение сывороточного альбумина). По завершении оценивали состояние легочной паренхимы и интенсивность воспалительного и аллергического процессов в легких с помощью большого набора морфологических и биохимических методов.

Оценка эффективности экспериментальной фармакотерапии (раздел 2.4) базировалась на ряде методов и показателей:

- Методы и показатели общей фармакологии и токсикологии: выживаемость и сроки гибели животных, весовой коэффициент легких, суммационно-подпороговый показатель, уровень артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС), регистрация ЭКГ, поведение животных в тесте «открытое поле», исследование спонтанной двигательной активности в

актометре и статической выносливости к мышечной нагрузке (оценка мышечной силы в силомере);

- Методы оценки и показатели состояния респираторной системы: показатели функции внешнего дыхания, его эффективности (потребление кислорода за 1 дыхательный цикл), интенсивности потребления кислорода животными;

- Показатели патологических и защитных процессов: маркеры цитолиза альвеолоцитов (активность щелочной, ЩФ, и кислой, КФ, фосфатаз крови) и токсемии (уровни олигопептидов и веществ низкой и средней молекулярной массы), состояние про- (концентрация в гомогенатах ткани легких малонового диальдегида, МДА) и антиоксидантной систем (уровень аскорбиновой кислоты и восстановленного глутатиона).

Приведенный перечень методов и показателей характеризует, с одной стороны, убедительность полученных данных и, с другой стороны, достаточно высокий уровень квалификации исследователя. Для большей четкости интерпретации данных, возможно, имело бы смысл выделить основные (первичные) конечные точки экспериментальной фармакотерапии (например, выживаемость, ВКЛ – весовой коэффициент легких и т.п.) и вторичные (суррогатные) конечные точки, которые расширяют картину пато- и саногенеза.

Оценка безопасности разработанного в диссертации препарата «Сальбуфен» (раздел 2.5) базировалась на стандартных методах острой и субхронической токсичности, которые хорошо поставлены в учреждении, в котором выполнялась работа.

Раздел 2.7, касающийся методов статистического анализа, очень лаконичен (4 абзаца). В нем не даны обоснования избранных статистических критериев значимости (более правильный термин, чем использованный «достоверность») отличий, не указывается на анализ нормальности распределения данных, в заголовке 2.7.2 упоминаются методы дисперсионного анализа (какие?), но далее они не раскрываются и в последующих главах данные дисперсионного анализа не представлены.

Диссертация содержит 195 страниц текста, который дополнен наглядными материалами (49 таблиц и 13 рисунков). Библиографический список включает 127 источников, из них 111 — отечественных, 16 — на иностранных языках. Автореферат отражает основное содержание диссертации. Работа написана хорошим языком, легко читается, таблицы и рисунки уместны и помогают восприятию текста.

В качестве замечания следует указать на необходимость упоминания в легендах ко всем таблицам и рисункам использованных статистических критериев значимости различий, а также параметров, отражающих вариабельность данных.

Глава 3 содержит описание использованных автором моделей острых ингаляционных поражений аммиаком, хлором и фосгеном на лабораторных грызунах. Автору удалось на основе хроноконцентрационного анализа убедительно доказать развитие токсического отека легких при соответствующих затравках, определить показатели, которые могут быть использованы для оценки эффективности экспериментальной фармакотерапии, в частности выживаемость, ВКЛ, время гибели 50% животных и выбрать оптимальные параметры затравок для фармакотерапевтической части работы.

Глава 4 посвящена отбору перспективных лекарственных препаратов и оценке их эффективности на экспериментальных моделях при моно- и комбинированной терапии. Основным для последующего развития исследования результатом явилось доказательство эффективности сочетанного ингаляционного введения сальбутамола и педифена, что легло в основу предложения о разработке оригинального препарата «Сальбуфен».

В главе 5 дано обоснование рецептуры препарата «Сальбуфен» и проведено экспериментальное исследование его эффективности на основе предшествовавших наработок. После подтверждения эффективности препарата была проведена оценка безопасности стандартными токсикологическими методами изучения острой и субхронической токсичности.

Автором разработана Инструкция по медицинскому применению препарата (ИМП), которая изложена в Приложении 1.

В кратком (2,5 страницы) заключении суммированы результаты проведенного исследования. Привычного по другим диссертациям обсуждения в работе нет.

Публикация результатов

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 12 печатных работах, в том числе в 2 статьях в рецензируемых ведущих научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ.

Вопросы, замечания и рекомендации

При внимательном прочтении текста диссертации возникают некоторые вопросы и замечания.

Вопросы:

1. В приложении 2 даны «Стандарты оказания помощи пораженным аммиаком и хлором». В тексте работы нет указания о статусе этого документа – является ли он действующим, кем и когда утвержден?
2. В разных местах текста диссертации при описании свойств педифена указывается его избирательное Н-холинолитическое действие, антиоксидантные свойства, мембраностабилизирующие свойства, спазмолитическая и местноанестезирующая активность, способность стимулировать ЦНС. Хотелось бы услышать мнение автора о том, какие фармакологические «мишени» он считает наиболее существенными для реализации терапевтических свойств вещества при поражениях, вызванных пневмотоксикантами?
3. Каковы показатели вариабельности летальных доз на стр. 131-132?
4. Каково, по мнению автора, потенциальное место «Сальбуфена» в лечении ХНЗЛ и будет ли препарат конкурентоспособным в условиях большого выбора препаратов данного профиля на рынке?

Замечания:

1. О замечаниях, связанных со статистикой и представлением данных на таблицах и рисунках с полным указанием статистических инструментов и критериев, указывалось выше.

2. Не всегда унифицирована терминология, в частности, чередуются в тексте обозначения «вес» и «масса тела».
3. В настоящее время в научных публикациях требуют обозначения лекарственных препаратов по их МНН, а не по торговым названиям. Поэтому обозначения препаратов «Беротек», а не фенотерол, «Эуфиллин», а не аминофиллин, не совсем корректны.
4. В таблице 18 (стр.121) во втором столбце, вероятно, должно быть указано время гибели 50% животных.
5. Вставленное в ИМП препарата показание «Предупреждение и купирование бронхоспазма при всех формах бронхиальной астмы» потребует специальных клинических исследований и соответствующего экспериментального обоснования. Без этого включение данного показания в проект ИМП представляется умозрительным.

Вышеуказанные вопросы носят уточняющий характер, а замечания не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Диссертация К.С.Колбасова «Экспериментальное обоснование комплексного лекарственного средства для ингаляционного применения при поражениях, вызванных пульмонотоксикантами», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.04 – токсикология и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология, выполненная под руководством доктора медицинских наук Е.Ю.Бонитенко и доктора медицинских наук В.А.Кашуро, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научно-практической задачи разработки эффективных и безопасных лекарственных средств для лечебно-профилактического применения при поражениях, вызванных пульмонотоксикантами, и имеющей существенное значение для развития токсикологии, фармакологии, клинической фармакологии.

Диссертация К.С.Колбасова «Экспериментальное обоснование комплексного лекарственного средства для ингаляционного применения при поражениях, вызванных пульмонотоксикантами» по своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, методическому уровню и достоверности полученных результатов соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.13 г. (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 N 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.04 – токсикология и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой фармакологии,
директор Института фармакологии
имени А.В.Вальдмана
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ
им.И.П.Павлова Минздрава России:

Звартау Эдвин Эдуардович

Тел.: 8 (812) 338 7023
Электронная почта zvartau@spb-gmu.ru
197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, 6-8,
главное здание (корпус №1), 2 и 3 этаж

Подпись профессора Звартау Эдвина Эдуардовича удостоверяю.

Учёный секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ
им.И.П.Павлова Минздрава России,
профессор:



Карпищенко С. А.

30.08.2016