

ОТЗЫВ

официального оппонента, члена-корреспондента и профессора РАН, доктора медицинских наук Галагудзы Михаила Михайловича на диссертационную работу Кашкина Владимира Александровича «Физиологические и фармакологические эффекты спиронолактона и канренона как перспективных средств лечения алкогольной зависимости», представленную к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы исследования. Актуальность темы обусловлена ростом распространенности аддиктивных расстройств (в том числе алкоголизма), а также недостаточной разработкой проблемы биологических основ указанного заболевания и путей направленного поиска средств его фармакотерапии. К сожалению, несмотря на значительные силы и средства, затраченные на изучение патогенеза алкоголизма, эффективность лекарственной терапии аддиктивной патологии в настоящее время находится не на должном уровне. Одним из объяснений этого феномена является недостаточность теоретических представлений о биологических механизмах развития данного заболевания. Отсутствие ощутимого прогресса в фармакотерапии алкоголизма влечет за собой необходимость дополнения теоретических представлений, лежащих в основе поиска лекарственных препаратов, применяемых в клинической наркологии. Принимая во внимание то, что хроническая экспозиция алкоголя влечет за собой дегидратацию клеток и тканей, а ключевой фермент электролитного обмена клетки - Na/K-АТФаза вовлечен в патогенез алкоголизма, актуальность темы данного исследования не вызывает сомнений. Учитывая также наличие антиалкогольного действия у эндогенного лиганда Na/K-АТФазы – маринобуфагенина, то исследование процессов осмотического дисбаланса клетки при воздействии алкоголя и ее коррекции представляется перспективным направлением.

Степень обоснованности сформулированных в диссертации научных положений и выводов. Шесть основных положений диссертации, вынесенных на защиту, подтверждены полученными автором данными, на основании которых обоснованно сформулировано шесть выводов.

Основанием для первого вывода и соответствующего ему положения 1 послужили экспериментальные данные, представленные в третьей главе диссертации,

раздел 1. Автором была изучена способность маринобуфагенина, эндогенного дигиталисоподобного фактора, вызывать фибротические изменения в тканях. Использование антагонистов минералокортикоидных рецепторов, спиронолактона и его активного метаболита, канренона, показало их способность конкурировать с маринобуфагенином за связь с Na/K-АТФазой. Полученные данные легли в основу выдвинутой автором гипотезы о том, что спиронолактон и канренон при помощи модуляции активности Na/K-АТФазы и конкуренции к маринобуфагенину за связь с этим ферментом, могут выступать как потенциальные лекарственные кандидаты с полипотентным механизмом действия в терапии алкоголизма вместо маринобуфагенина, который обладает антиалкогольным потенциалом, но проявляет профибротическую активность. Полученные данные позволяют репозиционировать известные лекарственные препараты спиронолактон и канренон в качестве потенциальных кандидатов для терапии злоупотребления алкоголем.

Второе положение и соответствующий ему второй вывод обоснованы изложенными в третьей главе, разделе 2 результатами изучения влияния спиронолактона и канренона на свободное употребление этанола экспериментальными животными. Автор показал, что указанные препараты дозозависимо уменьшают выработку и поддержание специфического поведения поиска и потребления алкоголя у крыс за счет физиологического (фармакологического) механизма, который исключает вовлеченность опиатной, но с возможным затрагиванием дофаминергической систем.

Вывод 3 и соответствующее положение 3 сформулированы на основании экспериментальных данных, полученных в ходе изучения антиалкогольной активности спиронолактона и канренона на модели свободного потребления этанола у животных. В проведенных тестах наблюдаемые отличия в предпочтении к потреблению алкоголя могли указывать на существование биохимического фактора в популяции, который может быть ответствен за предпочтение к алкоголю у крыс. В ходе исследований был определен возможный биохимический маркер предрасположенности к злоупотреблению алкоголем – уровень эндогенного маринобуфагенина, чем меньше был исходный уровень маринобуфагенина, тем выше потребление алкоголя было у экспериментальных животных.

Изложенные в главе 3, раздел 3 результаты экспериментов по изучению влияния спиронолактона и канренона на выраженность алкогольного рецидива у крыс послужили основанием для формулировок четвертого положения и, соответственно,

четвертого вывода. Автор продемонстрировал наличие у спиронолактона высокой эффективности в отношении купирования рецидива потребления алкоголя, которое заключалось в снижении выраженности депривационного эффекта алкоголя после введения спиронолактона. На фоне введения спиронолактона и канренона наблюдалось угнетение восстановления угнетенной оперантной реакции, вызванной стимулами, ранее ассоциированными с предъявлением этанола.

Данные, изложенные в главе 3, раздел 4, описывают результаты изучения механизмов вовлечения маринобуфагенина в патогенез острого алкогольного абстинентного синдрома. Анализ биохимических и физиологических изменений, происходящих у алкоголизированных крыс на фоне развития ААС, показал увеличение экскреции маринобуфагенина, задержку выведения натрия и снижение гематокрита с параллельным подъемом артериального давления. Следует заметить, что предварительное введение моноклональных антител против маринобуфагенина снижало прессорный эффект, вызванный синдромом отмены. Данное наблюдение указывает на то, что маринобуфагенин является не только маркером, но и выступает как медиатор гипертензии, ассоциированной с алкогольной абстиненцией. Также результаты, описанные в данном разделе, указывают на то, что фактором, связывающий маринобуфагенин с центральными механизмами алкогольной зависимости и водно-электролитного дисбаланса, является вазопрессин, который обладает собственным антиалкогольным эффектом. В эксперименте было показано, что экспериментально вызванная алкогольная абстиненция сопровождалась увеличением уровня вазопрессина в плазме крови по сравнению с контрольными животными, а на фоне введения моноклональных антител против маринобуфагенина увеличения концентрации вазопрессина в плазме крови было минимальным (положение 5 и вывод 5).

В заключении приводится обобщение полученных данных и разработка теоретической концепции нового направления фармакотерапии алкоголизма, действие которой базируется на изменении активности Na/K-АТФазы и модуляции эффектов ее эндогенных лигандов, возникающей при хроническом контакте организма с этанолом (положение 6 и вывод 6).

Достоверность и новизна научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Научная новизна работы заключается в выявлении широкого спектра возможностей антиалкогольного действия антагонистов минералокортикоидных

рецепторов. При этом использование репозиционирования лекарственных препаратов с известным фармакодинамическим и токсикологическим профилем за рамки их первичного применения, позволило снизить риски при поиске и разработке новых активных веществ и сформировать новое направление, направленное на лечение алкоголизма. Автором было показано, что спиронолактон и его активный метаболит канренон являются конкурентами маринобуфагенина за связь с Na/K-АТФазой и могут выступать как потенциальные лекарственные кандидаты для купирования бесконтрольного злоупотребления алкоголем. Впервые получены доклинические результаты, позволяющие позиционировать маринобуфагенин как возможный биохимический маркер предрасположенности к чрезмерному употреблению алкоголя. На экспериментальном уровне выявлен тот факт, что купирование мотивационно-подкрепляющего воздействия этанола на организм канреноном может быть реализовано в обход опиатной, но с возможным вовлечением дофаминергической систем. Получены принципиально новые данные, объясняющие вовлеченность Na/K-АТФазы и ее эндогенных лигандов в патологический процесс развития острого алкогольного абстинентного синдрома.

Все представленные в диссертации данные были получены в ходе выполнения сложных биохимических и поведенческих экспериментов с использованием соответствующей материально-технической базы. Высокий методический уровень, тщательно спланированный дизайн исследований, репрезентативные выборки и правильный способ статистического анализа результатов позволяют делать вывод о том, что представленные в работе данные являются достоверными.

Научно-практическая значимость работы заключается в создании теоретической базы, основанной на экспериментальном доказательстве нового направления лечения алкоголизма, которое опирается на модуляции активности Na/K-АТФазы и эффектов ее эндогенных лигандов. Практическая значимость работы заключается в выявлении возможности использования двух препаратов, с известным спектром фармакодинамического действия и относительной безопасностью применения в клинике, для лечения злоупотребления алкоголем. Учитывая то, что поиск и создание новых лекарственных кандидатов является длительным, дорогостоящим и рискованным процессом, полученные данные позволяют репозиционировать уже известные лекарственные препараты и, тем самым, расширить показания к применению за рамки их первичного применения. Кроме

этого, полученные в ходе исследования результаты могут помочь в дальнейшей разработке нового комплексного направления фармакотерапевтического воздействия при алкоголизме.

Общая характеристика работы. Оценка содержания работы, ее завершенности и оформления. Диссертация представлена на 326 страницах и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания методов исследования (глава 2), изложения полученных результатов исследований (глава 3, которая включает 4 раздела), общего заключения, выводов и списка литературы, включающего 628 источников, из них 20 - российские и 608 - зарубежные. Текст работы проиллюстрирован 77 рисунками и 11 таблицами.

Во *введении* описывается актуальность темы работы, формулируются её цели и задачи, выносимые на защиту положения, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также приводятся сведения о собственном вкладе в исследование и апробации его результатов.

В *первой главе (обзор литературы)* автор описывает современные представления о структуре, функциональной активности Na/K-АТФазы и ее эндогенных лигандов и физиологической роли различных изоформ натриевого насоса и различных классов его эндогенных лиганд. Автор проводит анализ нейробиологических механизмах подкрепляющего действия этанола и вовлеченности в этот процесс нескольких нейротрансмиссивных систем организма. Дано обоснование целесообразности возможного использования «репозиционирование» лекарственных средств за рамками их первичного применения, в отношении терапии алкоголизма.

В *главе 2 (методы исследования)* автор дает информацию о тест-системах и их подготовке и использованию в эксперименте, описывает методики определения активности Na/K-АТФазы, экспрессии коллагена и концентрации ее эндогенных лигандов, вазопрессина и натрия в моче и плазме крови. Подробно описаны методики поведенческого анализа. Представлены сведения о дизайне экспериментов, изучаемых фармакологических средствах и способах статистической обработки данных.

Глава 3, раздел 1 начинается с представления результатов собственных исследований о вовлечении лиганда α -1 изоформы Na/K-АТФазы – маринобуфагенина в процесс развития фиброза ткани, тем самым указывает на нецелесообразность применения данного лиганда, который обладает антиалкогольным эффектом, в

терапии алкоголизма. Далее описаны итоги серии опытов, где показано, что спиринолактон и канренон являются конкурентами к маринобуфагенину за связь с Na/K-АТФазой и могут быть репозиционированы, за рамки своего первичного применения в отношении лечения злоупотребления алкоголем. В итоговой части данного раздела представлены результаты пилотного исследования, которое подтверждает конкурентный тип взаимодействия канренона и маринобуфагенин у пациентов с хронической почечной недостаточностью.

Глава 3, раздел 2 приводит данные экспериментов по изучению эффектов спиринолактона и канренона в отношении свободного потребления этанола экспериментальными животными. Введение антагонистов минералокортикоидных рецепторов снижало добровольное употребление этанола у крыс, а также угнетало выработку оперантной реакции (нажатие на педаль) специфического поведения поиска и потребления алкоголя, что указывает на влияние тестируемых препаратов в отношении мотивационного компонента аддиктивного действия этанола, при отсутствии моторных нарушений после введения тестируемых препаратов. Антиалкогольные свойства спиринолактона и канренона реализуются без вовлечения эндогенной опиоидергической системы, что показано в серии экспериментов с оценкой дискриминативных стимульных свойств «классических» опиатов, и, возможно, частично затрагивают дофаминергическую систему, которое было доказано в опытах по оценке влияния сочетанного введения канренона и этанола на реакцию самостимуляции головного мозга у крыс. На фоне хронического употребления этанола было показано снижение повышенного систолического артериального давления, восстановление активности Na/K-АТФазы и значительное увеличение экскреции маринобуфагенина и натрия. В проведенных поведенческих тестах наблюдаемые отличия в предпочтении к потреблению алкоголя, указали на существование биохимического фактора в популяции, который может быть ответствен за предпочтение к алкоголю у крыс. В ходе дальнейших исследований был определен возможный биохимический маркер предрасположенности к злоупотреблению алкоголя – уровень эндогенного маринобуфагенина, чем меньше был исходный уровень маринобуфагенина, тем выше потребление алкоголя было у животного.

В главе 3, раздел 3 описаны результаты изучения влияния спиринолактона и канренона на выраженность алкогольного рецидива. Введение антагонистов минералокортикоидных рецепторов угнетало выраженность депривационного эффекта

этаноло, и блокировало восстановление, раннее угашенной реакции, вызванной стимулами, ранее ассоциированными с предъявлением этанола.

В главе 3, раздел 4 описаны результаты изучения вовлечения маринобуфагенина в патогенез острого алкогольного абстинентного синдрома. Анализ биохимических и физиологических изменений, происходящих у алкоголизованных крыс на фоне развития абстиненции, показал увеличение экскреции маринобуфагенина, задержку выведения натрия и снижение гематокрита с параллельным подъемом артериального давления. Следует заметить, что поднятие артериального давления было опосредовано увеличением экскреции маринобуфагенина. Данный факт был доказан предварительным (до начала абстиненции) введением моноклональных антител против маринобуфагенина, что привело к снижению прессорного эффекта, вызванного синдромом отмены. Данное наблюдение показывает, что маринобуфагенин является не только маркером, но и выступает как медиатор гипертензии, ассоциированной с абстиненцией. Также результаты, описанные в данном разделе, указывают на то, что фактором, связывающий маринобуфагенин с центральными механизмами алкогольной зависимости и водно-электролитного дисбаланса, является вазопрессин, который обладает собственным антиалкогольным эффектом. В эксперименте было показано, что экспериментально вызванная алкогольная абстиненция сопровождалась увеличением уровня вазопрессина в плазме крови, а на фоне введения моноклональных антител против маринобуфагенина увеличения концентрации вазопрессина в плазме крови было на 30% меньше.

Заключение является своеобразным итогом проведенной работы, где автор резюмирует её актуальность, полученные результаты и формирует теоретическую концепцию нового направления терапии алкоголизма. Шесть *выводов* соответствуют представленным данным и выносимым на защиту положениям.

В целом, оформление диссертации не вызывает нареканий, работа читабельна, представленная информация логично распределена по главам и параграфам. Иллюстрации четкие, понятные, с подробным текстовым описанием и указанием уровней статистической значимости выявленных изменений. Автореферат оптимален по размеру (45 страниц), соответствует содержанию диссертации, текст и рисунки читаются легко.

Полнота изложения материалов диссертации в публикациях. По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ, в том числе 17 статьи – в

рецензируемых журналах, входящих в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертаций. В опубликованных работах в полной мере изложены основные положения диссертации.

Замечания и вопросы.

При прочтении диссертации обращает на себя внимание злоупотребление автором англицизмами, а список литературы содержит всего 20 русскоязычных источника. Впрочем, это вполне может быть связано со спецификой темы исследования и не влияет на общую положительную оценку диссертации.

Вопросы к автору:

1. Спиринолактон обладает аффинитетом к рецепторному комплексу α -1 изоформы Na/K-АТФазы, конкурируя с эндогенным ингибитором Na/K-АТФазы маринобуфагенином. Чем объясняется отсутствие профибротического эффекта спинолактона, свойственного маринобуфагенину?
2. В работе показано, что маринобуфагенин оказывает профибротический эффект, а его фоновый уровень может значительно варьировать как у животных, так и у людей. Можно ли предполагать, что у лиц с более высоким уровнем маринобуфагенина имеет место меньшая предрасположенность к злоупотреблению алкоголем, но при этом более высокая интенсивность фиброза сердечно-сосудистой системы и паренхиматозных органов (почек, печени)?
3. Введение спинолактона вызывало у животных увеличение экскреции маринобуфагенина. Каков механизм этого эффекта?

Заключение

Диссертация Кашкина В.А. «Физиологические и фармакологические эффекты спинолактона и канренона как перспективных средств лечения алкогольной зависимости» является законченной научной квалификационной работой с выдвинутыми теоретическими положениями, которые можно расценить как научное достижение в области экспериментальной физиологии и фармакологии. Учитывая актуальность темы и высокий методический уровень исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, а также качество публикаций, считаю, что диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ

от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции от 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Кашкин В.А., заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Директор Института экспериментальной медицины,
при национальном медицинском исследовательском
центре им. В.А. Алмазова,
главный научный сотрудник НИО
микроциркуляции и метаболизма миокарда,
заведующий кафедрой патологии,
член-корреспондент и профессор РАН,
д.м.н.

Галагудза Михаил Михайлович

Адрес: 194156, Россия, Санкт-Петербург, пр. Пархоменко, д. 15., лит. Б
Института экспериментальной медицины
e-mail: galagudza@almazovcentre.ru
тел.: +7 (812) 702-51-68

« 01 » июня 2020 г.

