

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора кафедры общей физиологии ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет, Кривого Игоря Ильича, 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 избранной темы. Представленная работа В.А. Кашкина относится к одной из важнейших проблем современности, связанных с распространением разнообразных аддиктивных расстройств, включая алкогольную зависимость. К настоящему времени сформировано представление об основных звеньях патогенеза алкоголизма, которое затрагивают модуляцию таких основных нейротрансмиттерных систем, как ГАМКергическая, опиоидергическая и дофаминергическая. Предполагается, что важнейшую роль в этой патологии играет также водно-электролитный дисбаланс, возникающий при хроническом контакте организма с алкоголем. По этой причине изучение особенностей модуляции активности основного фермента водно-ионного баланса, Na/K-АТФазы, на фоне алкогольной интоксикации представляет несомненный интерес с точки зрения перспектив изучения механизмов формирования алкогольной зависимости и путей ее предупреждения и коррекции. В настоящее время для лечения алкоголизма и в качестве превентивных мер используются как медикаментозные, так и нелекарственные подходы. Однако механизм антиалкогольного действия применяемых препаратов во многом остается неясным, что требует проведения соответствующих экспериментальных исследований с использованием животных моделей хронического употребления этанола. Необходим также поиск новых средств и стратегий антиалкогольной терапии, в том числе на этапе доклинического скрининга. Осуществление такого рода исследований как раз и является предметом диссертационной работы В.А. Кашкина, поэтому её актуальность не вызывает сомнений.

Цель диссертационной работы – изучение физиологических и фармакологических механизмов реализации потенциальной антиалкогольной активности спиронолактона и канренона, как модуляторов Na/K-АТФазы, на экспериментальных моделях формирования хронической зависимости от этанола. Для достижения поставленной цели было определено шесть задач, успешно выполненных в ходе проведенного исследования.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. По результатам проведенного исследования автором вынесено на защиту шесть положений, суммированных в шести выводах.

Положение 1 и вывод 1 касаются экспериментальной оценки влияния спиронолактона и канренона на активность Na/K-АТФазы, а также данных об их способности конкурировать с маринобуфагенином за связывание с Na/K-АТФазой. Это позволило спрогнозировать наличие у данных препаратов антиалкогольного эффекта и позволило предположить возможность их применения для антиалкогольной терапии вместо маринобуфагенина, обладающего таким потенциалом, но проявляющего профибротическую активность.

Положение 2 и вывод 2 основаны на результатах, показавших, что спиронолактон и канренон подавляют у крыс признаки аддиктивности в отношении этанола, что сопровождается увеличением концентрации маринобуфагенина и натрия в моче, а также восстановлением активности Na/K-АТФазы с параллельным снижением систолического артериального давления. Оценка локомоторной функции и физической активности, а также дискриминативных стимульных свойств «классических» опиатов, показала отличие механизма антиалкогольного действия данных препаратов от опиоидного пути. Восстановление с помощью канренона порога электрической самостимуляции мозга, сниженного этанолом, указало на участие центральных механизмов, затрагивающих дофаминергическую систему, в реализацию эффекта данного препарата.

Положение 3 и вывод 3 основаны на экспериментальных данных о неоднородности употребления этанола крысами, что указывает на существование возможных биохимических маркеров предрасположенности к употреблению алкоголя. Продемонстрировано, что таким маркером может быть уровень эндогенного маринобуфагенина, который обратным образом коррелирует с уровнем индивидуального потребления этанола.

Положение 4 и вывод 4 сформулированы на основе данных экспериментов, которые показали, что спиронолактон и канренон подавляют рецидив после алкогольной депривации и угнетают восстановление сниженной оперантной реакции, вызванной стимулами, ранее ассоциированными с предъявлением этанола. Эти результаты указывают на возможность использования исследуемых препаратов для профилактики рецидивов алкоголизма.

Положение 5 и вывод 5 сформулированы на основании анализа биохимических и физиологических изменений при остром алкогольном абстинентном синдроме, который сопровождался задержкой выведения натрия, высоким уровнем маринобуфагенина в моче и вазопрессина в плазме крови, а также маринобуфагенин-зависимым увеличением артериального давления. При этом иммунологическая блокада маринобуфагенина снижала продукцию вазопрессина, что позволяет рассматривать маринобуфагенин как триггер высвобождения вазопрессина, обладающего собственным антиалкогольным эффектом, в результате чего происходит восстановление электролитного баланса.

Положение 6 и вывод 6 подводят итог исследования в целом. Сформирована теоретическая концепция нового направления фармакотерапии алкоголизма, которая основывается на частичном восстановлении активности Na/K-АТФазы за счет конкуренции с маринобуфагенином, следствием чего является уменьшение мотивационного компонента алкогольной зависимости.

В целом, большой объем проведенной экспериментальной работы позволил автору в должной степени обосновать все научные положения, выносимые на защиту. Выводы, сформулированные в диссертации, соответствуют положениям, выносимым на защиту, и отражают ключевые результаты, полученные в диссертации. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Достоверность результатов основывается на продуманном дизайне работы, достаточном объеме материала, современном и адекватном методическом уровне, корректных способах статистической обработки данных. Работа характеризуется рядом новых фактов, научных положений и выводов. Впервые показано, что спиронолактон и канренон являются конкурентами маринобуфагенина за связывание с Na/K-АТФазой. Это чрезвычайно важное наблюдение позволяет репозиционировать широко известные препараты за рамки их первичного клинического применения и рассматривать их в терапии алкоголизма в качестве потенциальных лекарственных кандидатов с полипотентным механизмом действия. Автором экспериментально продемонстрировано негативное влияние спиронолактона и канренона на инициацию и свободное потребление алкоголя, которое не затрагивает локомоторную активность животных и реализуется с возможным включением дофаминергической системы в обход опиоидергической. Впервые показано, что низкий уровень эндогенного маринобуфагенина является маркером предрасположенности к алкогольной зависимости. Угнетающее влияние исследуемых препаратов на выраженность депривационного эффекта этанола имеет потенциальное клиническое значение для купирования злоупотребления алкоголем и для поддерживающей противорецидивной терапии алкоголизма. К особо важным результатам следует отнести разработку теоретической концепции нового направления для фармакотерапии алкоголизма, действие которого базируется на изменении активности Na/K-АТФазы и модуляции эффектов ее эндогенных лигандов, следствием чего является уменьшение мотивационного компонента алкогольной зависимости.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные вносят важный вклад в понимание патофизиологических процессов алкоголизма и центральных механизмов его реализации. Автором продемонстрирована возможность использования двух

препаратов с известным спектром фармакодинамического действия и относительной безопасностью применения в клинике для антиалкогольной терапии. Полученные данные открывают новые направления и широкие перспективы для дальнейшего изучения молекулярных механизмов алкогольной зависимости и путей ее предупреждения и коррекции. Итогом успешной трансляции экспериментальных данных в реальную практику явились положительные результаты клинических наблюдений вовлеченности Na/K-АТФазы и ее эндогенных лигандов в патологические процессы при алкоголизме. Теоретическая значимость данной работы заключается в том, что полученные результаты приумножают и систематизируют сведения о механизме патогенеза алкоголизма, а также выявляют новые молекулярные мишени спиронолактона и канренона в терапии алкогольной зависимости.

Общая характеристика работы. Оценка содержания работы, ее завершенности и оформления. Диссертация написана по традиционной схеме, состоит из введения, литературного обзора, описания объектов и методов исследования, описания результатов исследования в четырех главах, обсуждения результатов, заключения и выводов. Работа изложена на 326 страницах, иллюстрирована 77 рисунками и 11 таблицами. Список литературы включает 628 источников, из них 20 отечественных и 608 зарубежных.

Во «Введении» изложена суть проблемы и обоснованы ее актуальность, цель и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, описаны научная новизна, научно-практическая значимость, собственный вклад в работу, приведены данные об апробации результатов исследования. Данная часть диссертации четко соотносится с выводами, сделанными в конце работы на основании анализа полученных результатов.

В «Обзоре литературы» изложены современные представления о структуре, функциональной активности Na/K-АТФазы и ее эндогенных лигандах. Рассмотрены данные о вовлеченности данной системы в различные физиологические и патофизиологические процессы, проанализирована и обобщена информация о нейробиологических механизмах действия этанола и вовлеченности в эти процессы нейротрансмиттерных систем. Дан анализ возможного использования уже известных препаратов для антиалкогольной терапии – так называемое «репозиционирование лекарств»; приведены данные о фармакологических свойствах ряда лекарственных препаратов в качестве потенциально применимых в терапии алкоголизма и для практического использования в наркологии. Обзор написан хорошим литературным языком и свидетельствует о прекрасном знании автором современного состояния в данной области и является солидным теоретическим фундаментом, используемым в дальнейшем для описания и обсуждения результатов. Эта часть работы позволила автору не только охарактеризовать всю проблему в целом, но и логически обосновать цель и задачи исследования.

В главе «Материалы и методы исследования» весьма квалифицированно и достаточно подробно описаны основные методические подходы, приводятся сведения о подготовке животных к опыту, изучаемых фармакологических средствах и протоколах экспериментов. Адекватность методических приемов не вызывает сомнений. В отдельном подразделе рассмотрены данные о статистической обработке и использованных критериях значимости.

Глава «Результаты и их обсуждение». В разделе 1 приводятся данные по изучению спиронолактона и канренона как конкурентов маринобуфагенина за связывание с Na/K-АТФазой. Эти результаты позволяют спрогнозировать наличие у данных препаратов антиалкогольного эффекта и рассмотреть их применение для терапии алкоголизма вместо маринобуфагенина, обладающего антиалкогольным потенциалом, но обладающего профибротической активностью.

В разделе 2 изучены антиалкогольные свойства спиронолактона и канренона в отношении инициации и свободного потребления этанола у крыс, а также их влияние на центральные механизмы аддиктивности в отношении алкоголя. Выявлены возможные биохимические маркеры предрасположенности к злоупотреблению алкоголем, в качестве такого маркера наибольший диагностический потенциал обнаружен у маринобуфагенина.

В разделе 3 показано, что спиронолактон и канренон способны подавлять рецидив злоупотребления этанола после алкогольной депривации и угнетать восстановление сниженной оперантной реакции, что указывает на возможность использования исследуемых препаратов для профилактики рецидивов алкоголизма.

В разделе 4 дан анализ событий, происходящих на фоне моделирования острого алкогольного абстинентного синдрома, который сопровождается задержкой натрия, увеличением экскреции маринобуфагенина, повышением систолического артериального давления и увеличением концентрации вазопрессина в плазме крови. Данные с применением иммунологической блокады маринобуфагенина при помощи моноклональных антител позволяют предположить, что маринобуфагенин является триггером высвобождения вазопрессина, который обладает собственным антиалкогольным потенциалом. Описаны результаты пилотного исследования, которые указывают на потенциальную возможность трансляции полученных экспериментальных данных в клинику алкоголизма.

Диссертация завершается общим «Заключением», где подводятся итоги выполненных исследований, сделанные выводы логически вытекают из результатов и полностью соответствуют положениям, вынесенным на защиту.

Публикация результатов. Материалы диссертации представлены в 28 научных работах, в том числе 17 статьях в ведущих рецензируемых научных журналах,

рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Автореферат и опубликованные работы в полной мере отражают основные положения диссертации.

В целом, представленная диссертация хорошо структурирована и логично построена; полученные данные содержат новые научные результаты и свидетельствуют о существенном личном вкладе автора диссертации в науку. Диссертация написана хорошим научным языком, экспериментальный материал удачно иллюстрирован.

Замечания и вопросы:

Работа не вызывает значительных замечаний по форме, способу изложения или содержанию. Тем не менее, по итогам ознакомления с диссертацией, возник ряд вопросов, требующих разъяснения.

1) Автор указывает, что маринобуфагенин – лиганд $\alpha 1$ изоформы, тогда как оубаин – лиганд $\alpha 3$ изоформы Na/K-АТФазы (табл. 4, стр. 72). Не ограничивает ли автор спектр изоформ альфа-субъединицы Na/K-АТФазы, для которых маринобуфагенин и оубаин являются специфическими лигандами?

2) Автор пишет (стр. 213): «Из проведенных экспериментов видно, что спиронолактон и канренон являются потенциальными конкурентами КТС на уровне их связывания с рецепторной частью Na/K-АТФазы». Как это можно объяснить, учитывая высокую специфичность сайта связывания кардиотонических стероидов?

3) Насколько можно экстраполировать данные, полученные на крысах, на человека, у которого, в отличие от грызунов, все изоформы альфа-субъединицы Na/K-АТФазы более чувствительны к кардиотоническим стероидам?

4) Автор отдает предпочтение сигнальному пути реализации эффектов маринобуфагенина. Что он думает по поводу механизма, обусловленного торможением активности Na/K-АТФазы?

Следует отметить, что заданные вопросы ни в коей мере не снижают общего положительного впечатления о работе.

Заключение

Диссертационная работа В.А. Кашкина «Физиологические и фармакологические эффекты спиронолактона и канренона как перспективных средств лечения алкогольной зависимости» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, заключающееся в предложении концептуального подхода к пониманию патогенеза алкоголизма и механизма действия средств его лекарственного лечения, имеющее существенное значение для развития физиологии, фармакологии и клинической фармакологии. По актуальности темы,

методическому подходу к решению поставленных задач, новизне полученных результатов, их научно-практической значимости и качеству публикаций 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, В.А. Кашкин, заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Профессор кафедры общей физиологии
ФГБОУ Санкт-Петербургского государственного
университета, доктор биологических наук



Кривой Игорь Ильич

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ

ЗАВЕРЯЮ



ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Литер А,
ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет;
Биологический факультет, кафедра общей физиологии
e-mail: iikrivoi@gmail.com
тел.: +7 921 3802953

«28» мая 2020 г.