

ОТЗЫВ

рецензента на диссертацию **Павловой Аллы Викторовны**
«Изучение производных природных монотерпеноидов в качестве основы для
создания высокоэффективных противопаркинсонических и анальгетических
лекарственных средств», представленную к защите на соискание
ученой степени доктора биологических наук
по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность исследования. Болезнь Паркинсона – нейродегенеративное заболевание, как правило, развивающееся у лиц пожилого и старческого возраста и характеризующееся избирательной гибелью дофаминовых нейронов в компактной зоне черной субстанции головного мозга. По данным ВОЗ ежегодный прирост заболевания в зависимости от страны колеблется в среднем от 72 до 258,8 на 100 000 человек (Китай и Индия, соответственно) (WHO, 2020). В РФ по оценкам 2016 этот показатель варьировал в пределах 120 – 180 человек на 100000, причем установлено, что признаки болезни Паркинсона проявляются у каждого десятого человека до 50 лет и у каждого двадцатого до 40 лет (http://ssmj.ru/system/files/2016_03_379-384.pdf), что, естественно, свидетельствует о серьезной социально-экономической проблеме в обществе. Через 10 лет после начала заболевания 2/3 больных становятся тяжелыми инвалидами или умирают, через 15 лет эта цифра достигает 80%.

Классической триадой симптомов заболевания являются двигательные нарушения (брадикинезия), экстрапирамидная мышечная ригидность (повышенный тонус), тремор в состоянии покоя. Кроме того, при данной патологии отмечают различные болевые синдромы, что способствует уменьшению двигательной активности у этих пациентов, и, в свою очередь, еще более усугубляет развитие заболевания в целом.

На текущий момент болезнь Паркинсона является неизлечимой, а существующие способы терапии этого заболевания носят лишь поддерживающий характер и направлены на повышение функциональной активности nigrostriарной системы головного мозга, что позволяет значимо улучшить качество жизни больного в среднем не более чем на 5 лет, после чего лечение становится менее эффективным и приводит к ряду осложнений (медикаментозная дискинезия и др.) (<https://www.neurology.ru/monografii-rukovodstva-i-metodicheskie-rekomendacii/bolezni-parkinsona-i-rasstroystva-dvizheniy>).

Поэтому ведется постоянный активный поиск новых методов фармакотерапии болезни Паркинсона с привлечением базовых научных исследований на максимально адекватных экспериментальных моделях патологии. В этой связи представленное А.В.

Павловой научное исследование природных монотерпеноидов, обладающих потенциальными высокоэффективными противопаркинсоническими и анальгетическими свойствами, является весьма актуальным.

В данной работе использовали перспективный подход, разработанный совместно с коллегами-химиками НИОХ СО РАН, для получения новых лекарственных средств, а именно синтез и изучение новых биологически активных соединений на основе известных природных монотерпеноидов: вербенола (терпеноид из вербены), изопулегола (спирт из эфирных масел), миртеналя (альдегид эфирных масел). Как показано в представленной диссертационной работе выделенные и модифицированные монотерпеноиды имеют высокий потенциал для применения в качестве эффективных ЦНС-активных лекарственных средств.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования.

В представленной работе А.В. Павловой впервые обнаружено и исследовано кислородсодержащее производное ряда монотерпеноидов – диол, который обладает противосудорожной активностью (тесты «коразоловая токсичность», «никотиновая токсичность»), низкой острой токсичностью (средне смертельная доза $LD_{50} = 4250$ мг/кг), а также выраженной противопаркинсонической и анальгетической активностью.

Противопаркинсонические свойства диола (дозы 10, 20 и 30 мг/кг) исследованы при разных способах введения (одно-, трех- и четырех- и десятикратно) нейротоксина 1 - метил – 4 - фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), способного избирательно повреждать дофаминергические нейроны черной субстанции головного мозга. Показано, что диол (20 мг/кг) статистически значимо улучшает показатели двигательной исследовательской активности животных в тесте «открытое поле» до контрольных значений. В экспериментах с хроническим введением МФТП (30 дней) диол проявлял более выраженную противопаркинсоническую активность, чем общепринятый при болезни Паркинсона лекарственный препарат леводопа. Причем подчеркивается, что диол оказывает только лечебное, но не превентивное действия; оценка последнего проводилась за 24 часа до введения МФТП.

Помимо противопаркинсонического действия диол обладает высокой анальгетической активностью, выявленной на моделях химического болевого («уксусные корчи») и термо-раздражения («горячая пластина»). Это говорит о том, что диол способен значительно снизить сопутствующую симптоматику заболевания (прежде всего боль) у людей, страдающих болезнью Паркинсона.

Важным открытием исследования является то, что активный метаболит диола – моноэпоксид также проявляет выраженную противопаркинсоническую активность, поскольку проходит через гематоэнцефалический барьер головного мозга и стимулирует рост дофаминовых нейронов у животных с индуцированным паркинсоническим синдромом, и, тем самым, увеличивает количество дофаминовых синапсов в стриатуме.

А.В. Павловой показано, что для проявления диолом противопаркинсонической активности является обязательным наличие в молекуле 2-х гидроксигрупп – в 5-ом и 6-ом положении ароматического кольца и изопропенильной группы в 4-ом положении. Это было продемонстрировано при синтезе ряда производных диола (соединения в диссертации 18-26), с модификацией в положении С-9, при введении различных заместителей, не вносящих изменения в абсолютную структуру молекулы диола, т.е. при сохранении всех четыре функциональных групп (две двойные связи и две гидроксигруппы), необходимые для проявления противопаркинсонической активности. Введение заместителей, содержащих гетероатомы в положении С-9, привело у исследуемых соединений либо к полной потери противопаркинсонической активности, либо частичной (для соединений 18 и 23). А введение в молекулу диола алифатического или тиаалифатического заместителя не препятствовало проявлению у исследуемых соединений выраженной противопаркинсонической активности.

Автором диссертации были исследованы метаболиты диола – эпоксиды (соединения 27 – 32). Обнаружено, что два эпоксида (соединения 27 и 30) проявляют противопаркинсоническую активность в модели паркинсонического синдрома, вызванного введением нейротоксина МФТП, а стереоизомеры (соединения 31 и 32) приводят к усугублению двигательных нарушений у животных. Наиболее подробно проанализировано соединение 27; показано, что оно стимулирует рост дофаминовых нейронов, увеличивая количество дофаминовых синапсов и, следовательно, уровень дофамина в стриатуме, что очевидно будет способствовать облегчению симптомов болезни Паркинсона.

Анальгетическая активность новых производных монотерпенового ряда была продемонстрирована на примере гетероциклических соединений 33 – 40, полученных путем взаимодействия (1*R*,2*R*,6*S*)-3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диола и эпоксида вербенола с ароматическими альдегидами, содержащими три метокси-группы. Показано, что анальгетическая активность присуща соединениям разных структурных типов с различным расположением метокси-групп в ароматическом кольце, что говорит о

перспективности дальнейшей разработки новых анальгетиков среди соединений, сочетающих монотерпеновый и ароматический фрагменты.

Следующие соединения (41 – 52), синтезированные на основе диола и сочетающие в своей химической структуре пара-ментановый и ароматический фрагменты, в отличие от соединений 33 – 40, различаются между собой только по заместителям в ароматическом кольце, а гексагидро-2Н-хроменовый остов остается неизменным. Представители этой группы проявляют разную анальгетическую активность (от выраженной до ее полного отсутствия), кроме того различающуюся в зависимости от теста («уксусные корчи» или «горячая пластина»). Аналогичным образом, в двух разных тестах проявляли разную противоболевую активность представители третьей группы соединений (53 – 65), содержащих гетероароматические (фурановые и тиюфеновые) заместители, и четвертой группы веществ (соединения 66 – 76), имеющих в структуре молекулы диазаадамantanовый и монотерпеноидный фрагменты. На основании данного обширного анализа А.В. Павловой был сделан вывод о том, что анальгетическую активность среди впервые-синтезированных соединений на основе монотерпеноидов проявляют не все агенты, наиболее перспективными являются соединения 44, 45, 54 и 66, для которых был проведен более подробный фармакологический скрининг. В итоге было показано, специфическое участие этих веществ в механизмах болевой чувствительности при отсутствии противовоспалительной активности, оцениваемой на модели воспалительного отека, вызванного введением формалина (3%) в подошвенный апоневроз стопы животных.

В работе подробно исследованы возможные механизмы действия монотерпеноидов и высказано предположение, что анальгетический ответ всех исследуемых соединений связан с каннабиноидными CB1 рецепторами, а для соединения 44 – еще и с опиоидными рецепторами центральной нервной системы. Кроме того, на примере блокады рецепторов основных нейромедиаторных систем исследовано участие соединений 44, 45 и 66 в регуляции активности серотонергической (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} и 5-HT₃ рецепторы), дофаминергической (D₁ и D₂ дофаминовые рецепторы), адренергической (α -адренорецепторы), ГАМКергической (ГАМК_A рецепторы), холинергической (мускариновые и никотиновые рецепторы) систем головного мозга. Сделан вывод о том, что все три соединения опосредуют анальгетический ответ, по крайней мере частично, через каннабиноидные CB1 рецепторы, вовлечение же других нейромедиаторных систем варьирует по-разному в зависимости от конкретного блокирующего вещества.

Для соединений 44, 45 и 66 не найдено выраженных побочных эффектов, в частности они не оказывают выраженного раздражающего действия на слизистую

оболочку желудка крыс, то есть обладают явным преимуществом по сравнению с группой нестероидных противовоспалительных препаратов, часто обладающих нежелательным гастротоксическим побочным эффектом

Таким образом в представленной А.В. Павловой диссертации всесторонне проанализированы новые монотерпеновые агенты, полученные на основе природных соединений, обладающие выраженной противопаркинсонической и анальгетической активностью, при отсутствии серьезных побочных эффектов. В этой связи они являются перспективные для разработки нового класса высокоэффективных терапевтических средств для лечения болезни Паркинсона с сопутствующими болевыми синдромами. Автор подчеркивает, что в настоящее время высокая эффективность действия диола способствовала продвижению его на первый этап клинических испытаний в качестве противопаркинсонического агента.

Общая характеристика диссертационной работы.

Диссертация состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 291 странице машинописного текста, иллюстрирована 60 таблицами и 20 рисунками. Библиографические ссылки включают 560 источников, из которых 515 – публикации зарубежных авторов.

Введение.

В этой главе в полной мере отражены актуальность исследования, методология и методы, показано активное участие автора на всех этапах проводимой работы. Однако, полагаю, что в разделе «Положения, выносимые на защиту» пункт 4 больше свидетельствует о практической значимости результата. С моей точки зрения оно больше соответствует разделу «Теоретическая и практическая значимость работы».

Обзор литературы.

Написан очень подробно и содержит 3 части. Первая часть «Болезнь Паркинсона. Лечение болезни Паркинсона и паркинсонического синдрома» содержит исчерпывающее количество информации о болезни Паркинсона, исследуемой как на системном, так и на молекулярном уровнях. Для удобства восприятия описываемых фактов в этой части, с моей точки зрения, не хватает разбивки на подразделы.

Во второй части обзора литературы «Лечение боли» следует также указать подразделы, поскольку кроме описания фармакологических средств, применяемых для лечения болевых синдромов, подробно описаны понятия и виды боли, а также вклад периферического и центрального звена нервной системы с описанием конкретных

рецепторов нейромедиаторных систем, в ее проявление. Эта часть написана излишне подробно, при этом некоторые абзацы, особенно исторический экскурс по некоторым препаратам (например, каннабиса) или детальное описание известных в клинической практике анальгетиков (аспирин, парацетамол) с частым повторяющимся перечислением одних и тех же побочных эффектов для каждого, можно сократить.

Третья часть «Фармакологические свойства монотерпеноидов» содержит подробное описание различных эффектов известных монотерпеноидов. Но, с моей точки зрения, не хватает заключительного вывода – почему были взяты конкретные соединения (описанные далее в разделе «Материалы и методы») для исследования их противопаркинсонических и анальгетических свойств.

Материалы и методы

Отвечает общепринятым критериям описания этого раздела. Достаточно подробное и понятное. В разделе «2.3.7. Гистологическое исследование» не обозначено что конкретно оценивали на гистологических срезах, то же самое относится к разделу «2.3.8. Исследование показателей крови».

Результаты и обсуждение

Практически во всех таблицах отсутствуют дозы используемых веществ, которые принято указывать.

Таблица 3.3. Нет обсуждения – почему введение предшественник дофамина L-ДОФА угнетает двигательную и исследовательскую активность и обуславливает замирание животных? С какими механизмами это может быть связано?

Непонятно разбиение результатов на 3 таблицы (3.6, 3.7 и 3.8), которые можно было бы объединить в одну таблицу. Аналогичная разбивка на несколько таблиц часто повторяется и при описании других результатов.

Таблица 3.15. Непонятно, почему количество вертикальных стоек не меняется, а число заглядываний в отверстия снижается на фоне всех введений препаратов? Эти показатели оба отражают исследовательскую активность. Как это объяснить?

При подробном описании метода гистологических исследований в главе «Материал и методы» приводится весьма лаконичное описание результатов, в одно предложение «При гистологическом исследовании сердца, печени и почек животных, которые получали ежедневно диол в дозе 20 мг/кг в течение 30 дней, отклонений в строении органов и тканей обнаружено не было». Хотелось бы видеть хоть несколько картинок гистологических срезов этих органов с указанием того, что конкретно смотрели и подтверждением, что конкретно не менялось.

Таблицы 3.30 – 3.58 переделать согласно замечаниям, указанным в тексте диссертации.

Таблица 60. Нет названия

Заключение.

Слишком подробное, с привлечением расширенного описания имеющихся литературных данных, которые уже были приведены в первой части диссертации. Описание известных клинических препаратов для лечения болезни Паркинсона и боли вообще можно убрать. Они доступны на любом сайте в интернете.

Выводы

С моей точки зрения стиль изложения должен быть типа «показано», «установлено» и т.п. Поэтому неприемлемо изложение в виде «было выбрано/выбраны...».

Вывод 4: какой конкретно метаболит диола?

Выводы 6 и 7: указать конкретно какие типы рецепторов нейромедиаторных систем подразумеваются.

Кроме того, по всей диссертации следует исправить все грамматические и стилистические ошибки, привести правильное сокращение единиц измерения и обозначить конкретные рецепторы при описании нейромедиаторных систем.

Не смотря на все вышеизложенные замечания, диссертация, несомненно представляет большой научный интерес и очень актуальна, поскольку позволяет приблизиться к открытию с перспективой применения в дальнейшем новых противопаркинсонических и анальгетических средств с длительным механизмом действия и без выраженных побочных эффектов.

Автор диссертации Алла Викторовна Павлова достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Рецензент

В.н.с., д.б.н. ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН Августиневич ДФ

Подпись
Заверяю

