

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор
по научно-исследовательской работе
ФГБОУ ВО «Ярославский государственный
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
Д.М.Н., профессор
П.М. Маслюков



2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-
практической значимости диссертации Маркина Павла Александровича
на тему «Методология фармакометаболического подхода в исследовании
фармакологических эффектов физиологически активных веществ на
модели *Danio rerio*», представленной к защите на соискание ученой
степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06 –
Фармакология, клиническая фармакология**

Актуальность темы выполненной работы

Поиск новых и высокоэффективных методов изучения фармакологических эффектов химических веществ и лекарственных средств является актуальной проблемой экспериментальной фармакологии. В настоящий момент основными направлениями оптимизации доклинических исследований являются поиск новых биологических моделей, поиск замен животным моделям (исследования *in vitro* и *in silico*), уменьшение количества используемых животных, а также разработка новых экспериментальных подходов исследования фармакологических эффектов.

Одним из перспективных методов изучения влияния химических веществ на организм является метаболомный анализ. Использование метаболомного анализа позволяет оценивать комплексное воздействие веществ на организм или системы органов посредством исследования набора эндогенных соединений, входящих в регуляторные процессы различных биохимических путей, которые могут представлять научный интерес.

Модернизация исследований фармакологических эффектов ФАВ включает также расширение спектра используемых биологических моделей. Одним из перспективных модельных организмов является *Danio rerio*. *Danio rerio* («зебрафиш», «полосатый данио») – сравнительно маленькая пресноводная тропическая рыбка семейства карповые. Ранее зебрафиш использовались в качестве модельного организма при изучении биологии развития систем органов в связи с прозрачностью эмбрионов и сравнительно быстрым развитием мальков – важнейшие системы органов развиваются к четвертому дню после оплодотворения икры.

В настоящее время с использованием мальков *Danio rerio* проводится изучение действия химических веществ на центральную нервную систему (ЦНС) с помощью различных поведенческих тестов. Также существуют методики изучения острой и хронической токсичности химических субстанций (определение полулетальной концентрации) визуальными методами.

Разработка методических и методологических основ фармакометаболомного подхода для исследования воздействия химических субстанций на рыб вида *Danio rerio* является важной стадией для начала широкого использования данной биологической модели для быстрого и высокоэффективного скрининга фармакологических эффектов веществ различной химической структуры. Все вышеизложенное свидетельствует о высокой актуальности темы диссертационного исследования Маркина П.А.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертация подготовлена при финансовой поддержке внутреннего гранта ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) в рамках реализации Федеральной программы «5-100».

Важнейшие положения диссертационной работы используются в учебной деятельности кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), внедрены в производственный процесс ООО «Институт аналитической токсикологии». На основе разработанной методологии и комплекса методик фармакометаболического подхода было выполнено государственное задание № АААА-А18-118091090038-2 на тему: «Разработка тест-системы быстрого установления наркотичности новых потенциальноопасных психоактивных веществ и метаболитная диагностика биомаркеров токсического стресса на «Зебрафиш моделях», лаборатория фармакокинетики и метаболитного анализа ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). Тема исследования относится к разработке методов изучения фармакологических эффектов химических веществ, а также поиску альтернативных биологических моделей.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Автором впервые доказана возможность использования мальков рыб вида *Danio rerio* для изучения фармакологических эффектов химических веществ, оказывающих влияние на ЦНС, с помощью нецелевого фармакометаболического профилирования.

На основе данных нецелевого профилирования автором была разработана оригинальная методика одновременного анализа концентраций панели нейромедиаторов и их метаболитов нескольких нейромедиаторных систем методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.

Автором впервые показано влияние диазепама на концентрации метаболитов серотонинергической и дофаминергической систем, системы аспартата, а также кинуренинового пути метаболизма триптофана.

Впервые было изучено воздействие синтетического каннабиноида 5F-АПИНАК на концентрации нейромедиаторов у мальков *Danio rerio*. Показано, что воздействие 5F-АПИНАК приводило к статистически значимым ($p < 0,05$) изменениям концентраций ГАМК, дофамина, триптофана и ацетилхолина как после краткосрочного (4 ч), так и после длительного (96 ч) воздействия.

Введение 5F-АПИНАК в среду обитания мальков зебрафиш вызывало дозозависимое уменьшение поведенческой активности, при этом автором впервые выявлены статистически значимые корреляции между результатами фармакометаболического анализа и поведенческих тестов.

Значимость результатов работы для науки и практики

Диссертационная работа Маркина П.А. обладает высокой научно-практической ценностью, в связи с тем, что автор доказал возможность применения фармакометаболических методов исследования нейротропных веществ с использованием инновационной биологической модели. С помощью разработанной автором методики направленного метаболического анализа было исследовано влияние двух нейротропных веществ на широкий профиль нейромедиаторов и их метаболитов, в ходе которого можно установить комплексное влияние нейротропных веществ на ЦНС.

На примере 5F-АПИНАК проведен анализ поведенческой активности мальков зебрафиш. Данные поведенческих тестов показывают статистически значимые корреляции с результатами фармакометаболических экспериментов, что указывает на перспективность дальнейших исследований в этой области.

Результаты диссертационного исследования создают научно-технический задел для начала высокопроизводительного изучения фармакологических эффектов химических веществ с использованием *Danio rerio* в качестве биологической модели.

Личный вклад автора

Личный вклад Маркина П.А. является определяющим и заключается в его непосредственном участии во всех этапах проведения исследования. Автор сформулировал идею и гипотезу диссертационного исследования, автором собран и проанализирован большой объем современной литературы по изучаемой проблеме, проведен широкий спектр экспериментальных работ, осуществлены анализ и интерпретация полученных результатов, подготовлены научные публикации.

Рекомендации по использованию результатов и выводов научно-квалификационной работы (диссертации)

Принимая во внимание несомненную практическую значимость выполненного исследования, результаты и выводы диссертации Маркина П.А. могут быть рекомендованы к внедрению в научно-исследовательскую работу лабораторий, кафедр, центров, специализирующихся на проведении исследований в области экспериментальной фармакологии, в частности отдела нейрофармакологии имени академика РАМН С.В. Аничкова ФГБНУ Института экспериментальной медицины, лаборатории психофармакологии ФГБНУ Научно-исследовательского института фармакологии имени В.В. Закусова. Теоретические положения исследования могут быть использованы для проведения исследований в области изучения фармакологических эффектов химических веществ, механизмом действия которых является влияние на сердечно-сосудистую, пищеварительную системы, среди прочих. Рекомендуется продолжить изучение влияния нейротропных веществ, обладающих различными механизмами действия.

Полнота изложения результатов исследования

По теме диссертационного исследования автором опубликовано 10 научных статей, из них 3 статьи опубликованы в журналах, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science, 1 статья – в журнале из Перечня Университета/Перечня ВАК при Минобрнауки. Результаты

диссертации обсуждались на конференциях всероссийского и международного уровней.

Общая характеристика работы

Диссертационное исследование Маркина П.А. выполнено в традиционном стиле, изложено на 207 страницах машинописного текста, включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты исследований, содержит обсуждение результатов, заключение, выводы и практические рекомендации.

Во введении автором обоснована актуальность избранной темы исследования, четко сформулирована цель и основные задачи работы, аргументированы и обоснованы научная новизна результатов исследования и их научно-практическая значимость.

Первая глава исследования представляет собой анализ отечественной и зарубежной литературы, в рамках которого автор широко обсуждает тематику классических методов, используемых в экспериментальной фармакологии, дает оценку применимости метаболомики в различных областях системной биологии, дает характеристику *Danio rerio* как биологической модели, а также приводит методические и методологические основы проведения фармакометаболического анализа. Обзор написан литературным языком, достаточно полно отражает данные литературы, касающиеся аспектов фармакометаболического анализа, а также использования *Danio rerio* как модельного организма.

В главе «Материалы и методы» детально охарактеризованы применявшиеся в работе методы исследования, выбор которых соответствует цели работы и поставленным задачам. В главе также приведены данные об использованных реактивах и оборудовании, методах статистической обработки данных.

В главе, посвященной результатам исследований, приведен большой объем данных, полученных в ходе работы. На первом этапе, автор провел нецелевое фармакометаболическое исследование, в ходе которого было

доказано воздействие диазепама на концентрации эндогенных молекул, связанных с метаболизмом нейромедиаторов, а также были определены основные метаболические пути и нейромедиаторные системы, анализ которых необходим для установления нейротропного эффекта химических веществ. Помимо этого, автором была доказана возможность использования мальков зебрафиш как биологической модели с целью изучения фармакологических эффектов с помощью фармакометаболических методов. Далее, автор разработал методику инструментального целевого определения метаболитов нейромедиаторных систем и произвел валидацию методики. В ходе валидации методики была установлена её пригодность по всем обязательным валидационным показателям.

С помощью разработанной методики целевого фармакометаболического профилирования было изучено краткосрочное и длительное влияние диазепама на концентрации нейромедиаторов и их метаболитов у мальков зебрафиш. Введение диазепама привело к статистически значимым различиям ($p < 0,05$) в концентрациях метаболитов серотонинергической, дофаминергической, холинергической систем.

Также автором было проведено исследование влияния синтетического каннабиноида 5F-АПИНАК на мальков *Danio rerio*. Полученные в ходе эксперимента результаты показали наличие изменений в концентрациях основных нейромедиаторов. При изучении изменений поведенческой активности мальков зебрафиш было обнаружено дозозависимое уменьшение пройденного расстояния, при этом результаты фармакометаболического анализа статистически значимо коррелировали с данными, полученными в ходе изучения поведенческой активности.

Изложение результатов диссертационной работы сопровождается их обсуждением. Автор анализирует полученные данные, проводит сравнение с данными литературы и аргументировано интерпретирует результаты исследования.

В заключительной части диссертации обобщены и проанализированы все полученные автором данные, свидетельствующие о высокой информативности проведенных исследований. Выводы, сделанные диссертантом, обосновано и логично вытекают из содержания работы. Выводы диссертации соответствуют поставленной цели и задачам.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

В целом, диссертационное исследование производит благоприятное впечатление. Диссертация написана литературным языком, хотя и содержит некоторые стилистические погрешности. Материал изложен доступно и воспринимается легко, текст дополнен богатым объемом иллюстраций – работа содержит 36 рисунков, 14 таблиц, 1 приложение. Работа оформлена в соответствии с принятыми нормативными требованиями.

Принципиальных замечаний к содержанию диссертации нет.

Заключение

Диссертационная работа Маркина Павла Александровича на тему «Методология фармакометаболического подхода в исследовании фармакологических эффектов физиологически активных веществ на модели *Danio rerio*» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи, имеющей существенное значение для экспериментальной фармакологии – разработки методических и методологических основ фармакометаболического анализа нейротропных веществ с использованием рыб вида *Danio rerio* как модельного организма. По актуальности, степени научной новизны, научно-практической значимости, работа Маркина Павла Александровича соответствует требованиям п.16 «Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения

Российской Федерации (Сеченовский Университет)», утвержденного приказом ректора от 31.01.2020 г. № 0094/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Маркин Павел Александрович, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология.

Отзыв о научно-практической значимости диссертации Маркина П.А. обсужден и утвержден на заседании кафедры клинической фармакологии и этики применения лекарств ЮНЕСКО (протокол № 4 от «24» мая 2022 г.).

Отзыв составил:

Заведующий кафедрой клинической фармакологии
и этики применения лекарств ЮНЕСКО
ФГБОУ ВО «Ярославский государственный
медицинский университет»

Минздрава России

чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор
(14.01.22 – Ревматология)

Александр Леонидович Хохлов

Подпись чл.-корр. РАН, доктора медицинских наук, профессора Хохлова А.Л. удостоверяю.

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России
к.м.н., доцент



Максим Петрович Потапов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
150000, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5
Тел.: 8(4852) 30-56-41; e-mail: rector@ysmu.ru