

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Ленской Карины Владимировны «Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук в диссертационный совет Д 208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Актуальность темы выполненной работы и ее связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельности.

Сахарный диабет типа 2 представляет собой серьезную медико-социальную проблему, значимость которой обусловлена его высокой распространенностью, хроническим течением, высоким уровнем инвалидизации и смертности больных.

Учитывая, что производные гуанидина, в частности метформин является «золотым стандартом» современной фармакотерапии сахарного диабета, интенсивно проводятся исследования для создания на базе гуанидинов новых лекарственных средств.

Несмотря на значительные достижения современной антидиабетической фармакотерапии отмечаются различные формы устойчивости к назначаемым препаратам, со сложным генезом развития побочных эффектов. Стадийность и особенности генеза сахарного диабета сказываются на развитии резистентности к лекарственным препаратам, либо оказывают большое количество отрицательных эффектов.

В существующем многообразии лекарственных препаратов, применяемых в клинике, не существует препарата, влияющего на патогенетические звенья сахарного диабета, кроме того длительная терапия любым из существующих препаратов приводит к развитию толерантности, поэтому целесообразность создания новых высокоэффективных и низкотоксичных препаратов остается актуальной. В настоящее время существует два подхода к поиску новых веществ с гипогликемической активностью: оптимизация структуры известных лекарственных препаратов для снижения токсичности и увеличение эффективности.

В работе Ленской Карины Владимировны разработана система ретроспективного и проспективного прогноза, позволяющая провести анализ

существующих баз данных по структуре и активности соединений для поиска новых эффективных гипогликемических веществ.

Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Впервые создан алгоритм направленного поиска *in silico* нового класса - производных циклических гуанидинов с гипогликемической активностью, основанная на консенсусе прогнозных оценок, полученных несколькими методами (система PASS, ИТ «Микрокосм», подструктурный анализ, частотный анализ физико-химических свойств, ADMET). Впервые выполнен анализ *in silico* механизма антидиабетического действия высокоактивного вещества класса циклических гуанидинов, проведено изучение *in silico* основных фармакокинетических, фармакодинамических, токсических свойств наиболее активных производных циклических гуанидинов. Впервые изучено влияние диабенола на активность следующих белков мишеней, регулирующих углеводный обмен: PYGL_{Cat}; JAK2 inh; PARP1; PDK4; MGAM_{AGlu}; HK-4; AMPK; PPAR_g agon; HK-4 activ; FBP1; PTP1B и AMPK. Впервые показано (*in silico*, *in vitro* и *in vivo*) отсроченное ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) диабенолом при курсовом введении.

Впервые изучена эффективность лекарственной формы в сравнении с субстанцией при курсовом введении. Показано, что лекарственная форма, как и субстанция, увеличивает секрецию инсулина, снижает гликемию, скорость гликолиза и гликогенолиза, а также повышает уровень гликогена в печени. Кроме этого, происходит снижение вязкости и тромбогенного потенциала крови.

Степень достоверности и обоснованности результатов и выводов.

Достоверность экспериментальных данных обеспечена применением верифицированных методов исследований, адекватных экспериментальных моделей и методов исследования *in silico*, достаточным количеством лабораторных животных (крысы линии Wistar и белые беспородные крысы (700), мыши (600) и кролики породы «Шиншилла» (10)). Анализ данных и их обобщение проведены с применением статистических методов, соответствующих характеру полученных данных и задачам диссертационной работы. Все выявленные закономерности, эффекты, обобщения и выводы подтверждены сериями экспериментов, компьютерных расчетов и результатами статистического анализа.

Научно-практическая значимость полученных соискателем результатов.

Создан банк данных производных циклических гуанидинов проявляющих гипогликемическую активность. В результате выявленных закономерностей между гипогликемической активностью производных бензимидазола (встроенных циклических гуанидинов) и их химической структурой разработана система поиска с использованием нескольких информационных технологий компьютерного прогноза для выявления наиболее значимых веществ, проявляющих гипогликемические свойства.

Определены перспективные базовые структуры для поиска и последующего изучения новых лекарственных веществ. Полученные экспериментальные данные позволяют проводить направленный поиск гипогликемических веществ среди циклических гуанидинов. Доказано, что эффективность лекарственной формы не уступает субстанции, что является доказательством целесообразности проведения клинических исследований. Комплексное исследование фармакологических и токсических свойств наиболее эффективных соединений позволяет наметить перспективы по созданию на их основе лекарственных препаратов с оригинальным механизмом действия для лечения сахарного диабета II типа.

Результаты работы внедрены в лекционные курсы кафедры фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, кафедры фармакологии Пермской государственной медицинской академии, кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета.

Общая характеристика работы. Диссертация изложена на 285 страницах машинописного текста, иллюстрирована 59 таблицами (а также 63 таблицами в приложениях), 38 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VIII), обсуждения результатов, заключения, включающего выводы, практические рекомендации, списка литературы и приложений. Список литературы включает 146 отечественных и 199 иностранных источника. К сожалению, автором допущены определенные небрежности при его оформлении.

Во введении обоснована актуальность избранной автором темы с учетом современного состояния и степени ее разработанности, четко сформулированы цель и

задачи исследования, выделены научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, представлены апробация результатов исследования, сведения о публикации основных результатов и возможности их внедрения, то есть отвечает всем основным формальным требованиям, которые предъявляются к этому разделу диссертации.

В первой главе представлен анализ отечественной и зарубежной литературы, обосновывающий гипогликемический потенциал циклических гуанидинов. Описываются новые подходы к поиску и созданию антидиабетических средств. В данной главе подтверждается, что циклические гуанидины являются новым классом гипогликемических средств. Заключительный раздел обзора посвящен разработке лекарственных веществ методами *in silico*.

Вторая глава посвящена виртуальному скринингу гипогликемической активности среди новых производных циклических гуанидинов. Для поиска соединений, обладающих гипогликемической активностью, были использованы методы компьютерной обработки информации. Применение системы PASS и информационной технологии «Микрокосм» позволило выделить несколько перспективных классов: N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а]бензимидазола. Анализ результатов прогноза гипогликемической активности показал, что основные перспективные классы имеют индекс информативности от 1.0 до 5.0, а подструктурный анализ перспективности различных классов циклических гуанидинов позволил установить, что наиболее перспективным химическим классом производных циклических гуанидинов является класс N⁹-ДгИмБИ. Выявлено, что наиболее лабильной структурой в отношении заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (максимальный супремальный показатель 0,36).

Консенсусный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов для обобщения всех ранее полученных компьютерных прогнозных оценок позволил выявить два наиболее перспективных класса циклических полных гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью: N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола. Виртуальный скрининг среди производных циклических гуанидинов позволил отобрать для дальнейшего

углубленного изучения соединения следующих химических классов: N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола.

Третья глава посвящена поиску соединений, оказывающих гипогликемическое действие среди новых производных циклических гуанидинов. В данной главе описано достаточно выраженное гипогликемическое действие производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных. На основании полученных данных по направленному поиску новых производных циклических гуанидинов было изучено влияние некоторых наиболее активных соединений изученных химических классов. В ходе эксперимента на модели стрептозотоцинового диабета было определено, что наиболее сильный гипогликемический эффект дает соединение РУ-254 (диабенол), сопоставимый по выраженности с препаратом сравнения метформином.

В главе 4 изложена зависимость гипогликемической активности соединений от их химической структуры и физико-химических свойств. С помощью частотного анализа установлен 41 физико-химический признак, влияющий на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Кроме этого, выявлены физико-химические признаки, определяющие высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

Для трех наиболее активных соединений с помощью программы FarmFor программного комплекса ИТ «Микрокосм» автором проведен сравнительный фармакофорный анализ, позволивший установить, что высокий уровень гипогликемической активности обуславливает заместитель R₃ – диэтиламиноэтил – (CH₂)₂N(C₂H₅)₂, а наиболее перспективным соединением является производное циклических гуанидинов под шифром РУ-254 (диабенол), которое было использовано для последующих фармакологических исследований.

В главе 5 изложены результаты изучения антидиабетогенных свойств диабенола. Показано гипогликемическое действие как для его субстанции, так и для гранулята таблеток на интактных кроликах.

Глава 6 посвящена изучению механизма антидиабетогенного действия диабенола (РУ-254). У соединения обнаружен инсулиногенный эффект, который приводит к снижению сахара в крови, а также способность снижать скорости

гликогенолиза и гликолиза в печени. Также автором установлено, что изученное соединение, в условиях экспериментального сахарного диабета, не оказывает прямого влияния на ключевые ферменты углеводного обмена, но косвенно изменяет метаболические процессы, ингибируя ДПП-4.

Глава 7 посвящена изучению влияния диабенола (РУ-254) на свертываемость крови и гемореологические свойства у крыс со стрептозотоциновым диабетом. В результате показано, что диабенол ингибирует функциональную активность тромбоцитов. Ему присуща как выраженная антиагрегантная активность, так и нормализующее действие на параметры вязкости крови (как гранулята таблеток, так и субстанции), учитывая гипервязкость, характерную для данной патологии.

При обсуждении результатов проведено обоснованное сопоставление полученных данных с литературными. Отдельно вынесено заключение, обобщающее все выявленные эффекты производных нового класса – циклических гуанидинов. Следует отметить, что автором без необходимости повторно использован рисунок, приведенный ранее в гл.6.

Работа написана хорошим научным языком, все сведения аргументированы, свидетельствуют о хорошей научной подготовке автора.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформированных в диссертации.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием адекватных и современных методов статистического анализа, проведенных при помощи современных методов статистического анализа.

Выводы, сформулированные автором по результатам проведенных исследований, а также положения, выносимые на защиту, соответствуют цели и задачам работы. Объем проведенных исследований и их дизайн полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям.

Работа выполнена на высоком методическом и методологическом уровне, что подтверждается широким спектром современных лабораторных методов исследования, адекватных поставленным задачам. Поставленную цель в диссертационной работе следует считать достигнутой благодаря корректной методической основе, полученные результаты, обладающие научной новизной, – весьма убедительными, а сформулированные по результатам исследований выводы -

аргументированными.

Соответствие автореферата основному содержанию диссертации.

Автореферат полностью отражает основные положения и результаты диссертационного исследования, оформлен в соответствии с ГОСТом, замечаний по автореферату нет.

Полнота публикаций по результатам диссертационного исследования.

По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, в том числе 13 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 7 глав в 2 монографиях.

Основные замечания и вопросы по диссертационной работе.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет, кроме незначительных редакционных, которые не носят принципиального характера и не умаляет общего положительного мнения о диссертации. В плане научной дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы:

1. Почему автором в описании результатов исследований *in vivo* не приводятся сведения о влиянии референсного препарата (метформина) при однократном и многократном введении исследуемого соединения?
2. Как автор может объяснить почти двукратное различие по накоплению гликогена в печени при использовании субстанции и гранулята таблеток?
3. Учитывая отсутствие влияния диабенола на активность гликогенфосфоорилазы, какие механизмы могут быть вовлечены в формирование гликогеноза в печени, учитывая, что печень относится к относительно инсулиннезависимым тканям?
4. Насколько обоснованно можно говорить о подавлении диабетомом глюконеогенеза, основываясь только на изменении концентрации аланина в крови, без использования специфических блокаторов этого процесса (например, 3-меркаптопиридоксина)?

Заключение.

Диссертационное исследование Ленской Марины Владимировны «Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств», представленное на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 –

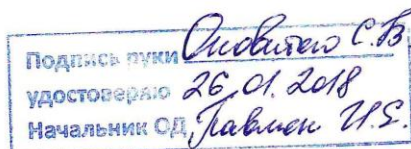
фармакология, клиническая фармакология, является самостоятельной завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи создания новых препаратов с противодиабетической активностью, имеющей существенное значение для фармакологии и фармацевтической химии.

По актуальности темы и решаемых задач; новизне полученных результатов; объёму, методическому и методологическому уровню проведенных исследований, теоретической и научно-практической значимости, полноте их опубликования, диссертационная работа полностью соответствует критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013г.), установленным для докторских диссертаций, а ее автор, Ленская Карина Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная
химико-фармацевтическая академия» Минздрава России
профессор



С.В. Оковитый



ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная Химико-фармацевтическая академия» Минздрава России 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14.
Телефон (812) 499-39-00, доп. 4090, e-mail: sergey.okovity@pharminnotech.com, <http://pharm-spb.ru>, <http://spcra.ru>.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

по диссертации Ленской Карины Владимировны «Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств»
на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

ФИО	Год рождения, гражданство	Место основной работы (с указанием организации, ее ведомственной принадлежности, города), должность	Ученая степень (с указанием шифра специальности, по которой защищена диссертация)	Ученое звание (по специальности, кафедре)	Шифр специальности и отрасли науки	Основные 3 работы (за последние 3 года)
Оковитый Сергей Владимирович	1968 г., РФ	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии и	Доктор медицинских наук (14.03.06-фармакология, клиническая фармакология)	Профессор по кафедре фармакологии	14.03.06-фармакология, клиническая фармакология, медицинские науки	1. Титович И.А., Сысоев Ю.И., Болотова В.П., Оковитый С.В. Нейротропная активность нового производного аминотанола в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 5. – С. 3-6. 2. Сысоев Ю.И., Мусиенко П.Е., Оковитый С.В. Влияние адренергических и холинергических средств на восстановление двигательных функций при поражении ЦНС // Экспериментальная и клиническая фармакология.-2017.- Т.80, №7.- С.37-44.
		клинической фармакологии				3. Куликов А.Н., Оковитый С.В., Ивкин Д.Ю. и др. Эффекты эмплаглифлозина при экспериментальной модели хронической сердечной недостаточности у крыс с нормогликемией // Журнал Сердечная недостаточность.- 2016.- Т.17, №6.- С.454-460.

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России
профессор

С.В. Оковитый

25 января 2018 г.

Подпись руки *Оковитый С.В.*
удостоверяю *25.01.2018*
Начальник ОД *Ивкин Д.Ю.*

