

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(НИУ БелГУ)

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной и
инновационной деятельности ФГАОУ

ВО «Белгородский государственный
национальный исследовательский университет»
доктор технических наук, профессор



Константинов Игорь Сергеевич

2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации 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 избранной темы. Известно, что 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, позволившая 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 создана система 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. Впервые 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}; НК-4; AMPK; PPAR_g agon; НК-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 гликоген в печени. Кроме этого, наблюдалось снижение вязкости и тромбогенного потенциала крови. Впервые изучен механизм гипогликемического действия твердой лекарственной формы диабенола.

Степень достоверности и обоснованности результатов и выводов. Достоверность экспериментальных данных обеспечивалась применением верифицированных методов исследований, экспериментальных моделей, лабораторных животных (крысах линии wistar и белых беспородных крысах (700), мышах (600) и кроликов-самцов породы «Шиншилла» (10) и методов исследования *in silico*. Анализ данных и их обобщение проведены с применением методов математической статистики и прикладной математики, соответствующих характеру полученных данных и задачам диссертационной работы. Все выявленные закономерности, эффекты, обобщения и выводы подтверждались сериями независимых 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 типа II. 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.

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.

В этой главе на первом этапе был проведен прогноз в системе PASS, который показал перспективность нескольких классов из всех изученных циклических полных гуанидинов. Далее был проведен прогноз в ИТ «Микрокосм» наличия гипогликемической активности производных циклических гуанидинов, путем анализа перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" по выборке известных противодиабетических препаратов.

После проведенного прогноза в ИТ "Микрокосм" антидиабетической активности и выделения наиболее перспективных для дальнейшего изучения классов, провели прогноз уровня гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов. Для этого прогноза использовали также информационную технологию «Микрокосм» и выборку по ранее изученным производным этого ряда. После прогнозирования наличия гипогликемической активности исследуемых классов проанализировали результаты прогноза выраженного уровня гипогликемической активности для производных циклических полных гуанидинов. По данным прогноза выраженной гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены несколько перспективных классов: N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазолы[1,2-а]бензимидазола, N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо-[1,2а]бензимидазола. Заключительным этапом служил анализ результатов прогноза высокой гипогликемической активности в ИТ "Микрокосм" исследуемых классов, который показал следующие результаты: основные перспективные классы имеют индекс информативности от 1.0 до 5.0. Кроме этого, в данной главе был проведен подструктурный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов который показал, что наиболее перспективным и статистически достоверным 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).

В данной главе был также проведен консенсусный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов. Использование консенсусного анализа для обобщения всех ранее полученных компьютерных прогнозных оценок позволило 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. Был также проведен виртуальный скрининг среди производных циклических гуанидинов для дальнейшего углубленного изучения и были выбраны соединения следующих химических классов: 2-имино-бензимидазола; 2-амино-бензимидазола; N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензимидазола; N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы; 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а] бензимидазола.

По результатам анализа *in silico* перспективности производных циклических гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью, наиболее перспективными выявили два класса: 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 было показано 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 наблюдался у препарата РУ-254 (практически равный по силе препарату

сравнения метформину), относящегося к классу производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

В главе 4 изучена зависимость гипогликемической активности соединений от их химической структуры и физико-химических свойств. Был проведен частотный анализ, в ходе которого найден 41 физико-химический признак, влияющий на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Кроме этого, в результате частотного анализа были выявлены физико-химические признаки, статистически достоверно влияющие на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола. Подструктурный анализ выполняли по алгоритму, описанному выше, в главе 2. На основании проведенного подструктурного анализа установлено, что есть статистически достоверный заместитель R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, который обуславливает высокий уровень гипогликемической активности. Для трех наиболее активных соединений с помощью программы FarmFor программного комплекса ИТ «Микрокосм» был проведен сравнительный фармакофорный анализ. Фармакофорные спектры трех соединений-лидеров формировались из присутствующих в структуре этих соединений статистически значимых QL-признаков 4-го ранга, полученных для всех пяти уровней значимости, по обеим обучающим выборкам и всем градациям активности. В ходе подструктурного анализа влияния заместителей на гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов установлено, что есть статистически достоверный заместитель R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, который обуславливает высокий уровень гипогликемической активности.

На основании фармакофорного анализа выявлено, что наиболее перспективным соединением, с точки зрения наличия в химической структуре фрагментов, ответственных за достаточно высокий уровень гипогликемической активности, является соединение производное циклических гуанидинов класса N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола. В данной главе была проведена оценка специальных характеристик ADME, рассчитанных с помощью модуля

QikProp системы Schödinger, которая, в общем, показала соответствие соединений-лидеров всем основным референсным физико-химическим параметрам. Таким образом, на основе проведенных исследований выявлено соединение-лидер (РУ-254), которое было использовано для последующих фармакологических исследований.

В главе 5 были исследованы антидиабетогенные свойства соединения диабенол.

Было показано гипогликемическое действие (достоверное снижение уровня сахара в крови) и субстанции и гранулята таблеток на интактных кроликах.

Далее исследования проводили на крысах с моделированным стрептозотоциновым диабетом, при однократном введении субстанции диабенола (РУ-254). Субстанцию диабенола изучали в трех дозировках: 25, 50 и 100 мг/кг при пероральном введении. При курсовом введении были изучены колебания уровня сахара в крови на протяжении 28 дней введения диабенола в виде субстанции и гранулята таблеток (в дозе 50 мг/кг). Было показано, что субстанция и гранулят таблеток диабенола (РУ-254) обладает антидиабетогенными свойствами, влияя на углеводный обмен и увеличивая утилизацию глюкозы.

Глава 6 посвящена изучению механизма антидиабетогенного действия диабенола.

Обобщая цикл исследований, по механизму действия диабенола (РУ-254), в данной главе доказано, что инсулиногенный эффект, который приводит к снижению сахара в крови, а также снижение скорости гликогенолиза и гликолиза в печени. Вероятнее всего, 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 исследований, проведенных на животных со стрептозотоциновым диабетом, было показано, что диабенол

ингибирует функциональную активность тромбоцитов. Ему присуще, 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.

Выводы и научно-практические рекомендации подтверждены полученными результатами, обоснованы и представлены в соответствии с целью и задачами 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.

Автореферат соответствует содержанию диссертации

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет, кроме незначительных редакционных, которые не носят принципиального характера и не умаляет общего положительного мнения о диссертации.

Заключение. Диссертационная работа Ленской Марины Владимировны «Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств» является самостоятельной завершенной 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; объему, 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.

Отзыв на диссертацию обсужден на заседании кафедры фармакологии Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», протокол № _____ от _____ 2017 года.

Сведения о ведущей организации: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»)

Директор НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ», заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Минобрнауки России,

доктор медицинских наук,

профессор

Покровский Михаил Владимирович

Подпись доктора медицинских наук, профессора Покровского Михаила Владимировича заверяю.

Адрес: 308015 г. Белгород, ул. Победы, 85.

Тел.: (4722) 30-12-11

Электронная почта: Info@bsu.edu.ru

Сайт: www.bsu.edu.ru



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по диссертации 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.

Полное наименование организации	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
Сокращенное наименование организации	ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», НИУ «БелГУ»
Адрес организации	308015, Российская федерация, город Белгород, улица Победы, дом 85
Контактный телефон (с кодом города)	Тел.: +7 (4722) 30-12-11
Адрес электронной почты	Info@bsu.edu.ru
Ведомственная подчиненность	Министерство образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России)
Сведения о руководителе ведущей организации	Полухин Олег Николаевич – ректор, доктор политических наук, профессор Контактная информация: Тел.: +7 (4722) 30-12-11 Факс: +7 (4722) 30-12-13 e-mail: Rector@bsu.edu.ru
Сведения о заместителе руководителя ведущей организации	Константинов Игорь Сергеевич – проректор по научной и инновационной деятельности, доктор технических наук, профессор Тел.: +7 (4722) 30-10-23 e-mail: ViceRectorScience@bsu.edu.ru
Сведения о составителе отзыва из ведущей организации	Покровский Михаил Владимирович – заведующий кафедрой фармакологии Медицинского института, директор Научно-исследовательского института фармакологии живых систем НИУ «БелГУ», доктор медицинских наук, профессор Контактная информация: Тел.: +7 (4722) 30-18-59

Основные работы (за последние 5 лет)	e-mail: rokrovskii@bsu.edu.ru 1) Ким Г.А. ГАМК_A-рецепторные механизмы противоопиоидического цереброваскулярного эффекта S-амлодипина никотината [Текст] / Г.А. Ким, Т.С. Ганьшина, Е.В. Васильева [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 5. – С. 7-10. 2) Покровский М.В. Исследование эндотелиопротективной активности фенольных производных – ингибиторов аргиназы-2 и тромбина [Текст] / М.В. Покровский, М.В. Корокин, К.В. Кудрявцев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 163, № 4. – С. 431-434. 3) Кардиопротективные эффекты инкретиномиметиков эксенатидана и видаглиптина при моделировании доксорубициновой кардиомиопатии [Текст] / А.П. Тарасова, А.В. Хаванский, А.С. Тимохина, А.П. Довгань // Кубанский научный медицинский вестник. 2017. Т. 24. № 3. С. 106-113. 4) Бесхмельницына Е.А. Молекулярный поиск перспективных молекул-кандидатов в селективные антагонисты ионного канала TRPA₁ [Текст] / Е.А. Бесхмельницына, Д.В. Кравченко, М.В. Покровский [и др.] // Вестники Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2017. – Т. 7, № 3. – С. 186-189. 5) Development and validation of methods of quantitative determination of the new antidiabetic drug in the blood plasma of rats by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection <i>Vizov A.A., Kilikov A.L., Avtina T.V., Rokrovskii M.V., Osipova O.A.</i> Research Result: Pharmacology and Clinical Pharmacology. 2016. Т. 2. № 1. С. 52-57.
---	--

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»; ректор д.полит.н., профессор О.Н. Полухин; проректор по научной и инновационной деятельности д.т.н., профессор И.С. Константинов (308015, Российская Федерация, город Белгород, улица Победы, дом 85, тел. +7 (4722) 30-12-11, e-mail: Info@bsu.edu.ru).

Проректор по научной и инновационной деятельности,
д.т.н., профессор



И.С. Константинов