

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Сиротенко Виктора Сергеевича «Антитромбогенные свойства новых трициклических производных диазепино[1,2-а]бензимидазола», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук в диссертационный совет Д 208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

### Актуальность

Сердечно-сосудистые заболевания несколько десятилетий занимают лидирующее положение в общей структуре заболеваемости и смертности во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения в 2016 году было зарегистрировано более 25 млн. осложнений, связанных с тромбообразованием, таких как ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром, ишемический инсульт, нарушение периферического кровообращения в конечностях, осложнения сахарного диабета и др. Поэтому вопрос профилактики этой патологии является краеугольной проблемой в современной медицине. Многочисленные исследования по оценке действия антитромбоцитарных препаратов доказали их клиническую эффективность и вывели их на первый ряд лекарственных средств, используемых для терапии и профилактики тромботических осложнений. Однако несмотря на эффективность и высокую степень доказательности современные лекарственные средства обладают рядом побочных явлений, ограничивающих их практическое применение. Среди них наиболее характерными являются гастротоксичность, риск кровотечений, развитие резистентности, тромбоцитопении. Поэтому разработка новых препаратов, влияющих на функциональную тромбоцитов эффективно и с минимальным риском развития побочных эффектов актуальна.

### Научная новизна исследования

В ходе проведенного исследования диссертантом впервые было изучено влияние новых производных ряда 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazепино[1,2-а]бензимидазола на процессы агрегации тромбоцитов. Впервые установлена

взаимосвязь между структурой данных соединений, и их способностью угнетать функциональную активность тромбоцитов. Выявлено новое соединение под шифром ДАБ-15, проявляющее антиагрегантные свойства и получены данные о его влиянии на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз *in vitro* и *in vivo*. Впервые показано, что соединение ДАБ-15 оказывает антитромботическое действие на различных моделях артериальных и венозного тромбозов, а также при экспериментальном некоронарогенном инфаркте миокарда.

### **Научно-практическая значимость исследования**

Результаты установленной зависимости между антиагрегантной активностью новых производных 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола и их химической структурой могут служить основой для направленного поиска новых антиагрегантных соединений. Получены данные о наличии антитромботической активности у соединения ДАБ-15 на моделях экспериментальных тромбозов сонной артерии крыс, индуцированных поверхностной аппликацией хлорида железа (III) и воздействием электрического тока в норме и при экспериментальном инфаркте миокарда, на модели генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза, а также показана высокая антитромботическая активность соединения-лидера в отношении тромбоза нижней полой вены. Соединение ДАБ-15 менее выражено влияет на время кровотечения по сравнению с препаратами сравнения ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелем. Установлено, что исследуемое вещество обладает комбинированным антитромбоцитарным механизмом действия (ингибирование синтеза тромбоксана А<sub>2</sub>, блокирование гликопротеинового рецептора VI тромбоцитов, а также снижение активности внутриклеточной сигнальной системы тромбоцитов).

### **Достоверность и апробация результатов исследования**

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом и качеством выполненных исследований, проведенных на кроликах, мышах и крысах самцах; использованием современных методов и методических подходов, высокотехнологического оборудования в соответствии

с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с антитромбогенной активностью, а также критериев статистической обработки данных.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XIX, XX и XXII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области; 73, 74, 75 и 76-й открытой научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2015, 2016, 2017, 2018 гг.; на III-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения», Пятигорск, 2014; на Объединенном Конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 8-ой Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии Москва, 2016; на XX Менделеевском съезде, Екатеринбург, 2016.

По теме диссертации опубликовано 22 работ (из них 9 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ).

#### **Общая оценка содержания и оформления диссертации**

Диссертация Сиротенко В.С. выполнена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ и изложена на 158 страницах, иллюстрирована 21 рисунком и 36 таблицами. Состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (2-5 главы), обсуждения результатов, выводов и списка литературных источников, включающего 31 отечественных и 138 зарубежных источника.

Во введении автор подтверждает актуальность и степень разработанности исследования, формулирует цель и задачи исследования, приводит данные по научной новизне и научно-практической значимости работы. Также автор приводит сведения о методологии и методах исследования, внедрении, степени достоверности и апробации результатов работы, указывает положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор современной литературы, посвященной исследуемой проблеме. Первый раздел включает обзор известных антиагрегантных средств, разделенных по принципам доказательной медицины, включающим эффективность лекарственных средств и побочное действие. Во втором разделе приведены новые потенциальные мишени для направленного поиска новых антитромбоцитарных агентов. Заключительный раздел посвящен спектру фармакологической активности производных бензимидазола.

Во 2-й главе автором детально описаны использованные методы исследований *in vitro* и *in vivo*, а также методы статистической обработки результатов. Представлено обоснование выбора вида и количества животных для серий опытов *in vivo* согласно методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований лекарственных средств, влияющих на систему гемостаза. Подробно описаны методы тромбоза сонной артерии аппликацией раствором хлорида железа и воздействием электрического тока, венозный тромбоз, а также генерализованный адреналин-коллагеновый тромбоз. Для детального изучения механизма действия диссертантом были выбраны специфические методы анализа: изучение влияния ДАБ-15 на баланс в системе тромбоксан – простагландин методом ИФА, установление влияния на выброс ионов кальция из внутриклеточных депо хранения, а также секрецию АТФ, использована модель агрегации тромбоцитов, индуцированная различными индукторами (АДФ, адреналин, коллаген, арахидоновая кислота, ристоцитин, U46619, PAR1-агонист, фактор активации тромбоцитов), изучено влияние соединения ДАБ-15 на адгезивные свойства тромбоцитов методом импеданса.

Третья глава включает скрининг 19 новых производных диазепино[1,2-а]бензимидазола на наличие антиагрегантной активности *in vitro*, а также исследование антиагрегантной активности в условиях целостного организма *in vivo*. Изучена зависимость активности в ряду 2,3,4,5-тетрагиро[1,3]дiazепино[1,2-а]бензимидазола от химической структуры. Приведены данные изучения острой токсичности соединения-лидера ДАБ-15.

Четвертая глава описывает антитромботическое действие соединения ДАБ-15 на различных моделях артериальных и венозного тромбозов, включая модель тромбоза сосудов легких мышей. Диссертантом было изучено антитромботическое действие ДАБ-15 в условиях повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога. Также в этой главе приведены данные об антитромбогенной активности ДАБ-15 в условиях экспериментального инфаркта миокарда. В заключении автором было исследовано влияние ДАБ-15 и препаратов сравнения на время кровотечения.

В 5-й главе автор приводит результаты детального изучения механизма антиагрегантного действия соединения ДАБ-15. Диссертантом было исследовано влияние соединения-лидера на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами указанного процесса. Методом ИФА было проведено исследование влияния ДАБ-15 на баланс тромбоксана  $B_2$  и 6-кето-простагландина. Так как различные пути активации тромбоцитов приводят к увеличению уровня внутриклеточного кальция, было установлено, что соединение-лидер дозозависимо ингибирует выброс внутриклеточного кальция. Люминисцентным методом детекции было показано влияние на секрецию АТФ из плотных гранул тромбоцитов. Приведены данные о влиянии ДАБ-15 на процессы адгезии тромбоцитов к микрофибриллам коллагена.

6-я глава посвящена обсуждению полученных автором результатов исследования, их сопоставление с данными современной литературы. Автором грамотно интерпретированы все результаты исследования и сделано логичное обоснование и предположение о комбинированном механизме действия соединения-лидера, заключающегося в ингибировании секреции проагрегантных агентов из гранул тромбоцитов, синтеза тромбоксана  $A_2$ , а также блокировании гликопротеина VI к коллагену.

Диссертация завершается 7 выводами. Автореферат отражает основное содержание диссертации и оформлен в соответствии с современными требованиями.

Принципиальных замечаний по работе нет, однако имеются вопросы, которые носят уточняющий характер.

1. С какой целью для оценки антитромботической активности была использована тест-система Горога?
2. Как можно экстраполировать результаты Вашего экспериментального исследования на человека?

### Заключение

Диссертация Сиротенко Виктора Сергеевича «Антитромбогенные свойства новых трициклических производных диазепино[1,2-а]бензимидазола», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, является законченным исследованием, может считаться новым достижением в развитии фармакологии средств снижающих тромбогенный потенциал крови.

По разделам работам полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г.)», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Директор НИИ фармакологии живых систем НИУ «БелГУ Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России, д.м.н., профессор



М.В. Покровский

«»  2018 года

Адрес: Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85  
Телефон: 8 910 314 73 93  
E-mail: [mpokrovsky@yandex.ru](mailto:mpokrovsky@yandex.ru)



Публикации, близкие к тематике диссертационного исследования

1. Pokrovskii M.V., Korokin M.V., Kudryavtsev K.V., Pokrovskaya T.G., Gudyrev O.S., Gureev V.V., Korokina L.V., Povetkin S.V. Study of Endothelial Protective Activity of Phenol-Derived Thrombin and Arginase-2 Inhibitors KUD-259 and KUD-974//Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. T. 163. № 4. С. 436-438.
2. Колесник И.М., Покровский М.В., Покровская Т.Г., Гудырев О.С., Даниленко Л.М., Корокин М.В.,Алехин С.А., Григоренко А.П., Старосельцева О.А., Должикова И.Н., Братчиков О.И.,Молчанова О.В., Ефременкова Д.А., Полянская О.С., Филимонов В.А. Фармакологическое прекондиционирование эритропоэтином при ишемии конечности//Биомедицина. 2011. Т. 1, № 4. С. 90-92.
3. Корокин М.В., Покровский М.В., Новиков О.О., Гуреев В.В., Денисюк Т.А., Корокина Л.В.,Полянская О.С., Рагулина В.А., Покровская Т.Г., Даниленко Л.М., Белоус А.С. Влияние L-аргинина, витамина В6 и фолиевой кислоты на показатели эндотелиальной дисфункции и микроциркуляции в плаценте при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота//Бюл. exper. биол. 2011. Т. 152, № 7. С. 77-79.

## Научная новизна исследования

В ходе проведенного исследования диссертантом впервые было изучено влияние новых производных ряда 2,3,4,5-тетрагидро[1,3]дизалано[1,2-а]бензимидазола на процессы агрегации тромбоцитов. Впервые установлена