

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, профессора, заведующего кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университета имени М.В. Ломоносова» Калениковой Елены Игоревны на диссертацию Клочкова Владлена Геннадиевича на тему «Фармакологические свойства новых производных 2-оксиндола», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук в Диссертационный совет 21.2.005.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология.

Актуальность проблемы

Рецензируемая работа посвящена изучению фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола, в частности поиску веществ с ингибирующей альфа-глюкозидазу и/или киназу гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B) активностью. Влияние на выбранные фармакологические мишени может быть использовано для терапии сахарного диабета 2 типа (СД2) и его осложнений, что является высоко актуальным направлением поиска новых фармакологически активных соединений. Выбранное направление исследований относится к современным глобальным проблемам фармакологии, поскольку затрагивает терапию социально значимого заболевания, при этом разнообразие разработанных классов противодиабетических препаратов, к сожалению, не обеспечивает все необходимые потребности практической диабетологии. По своей сути работа представляет собой фундаментальный труд, направленный на решение важных практических медицинских задач. Она построена на современной концепции развития СД2, использует адекватные модели развивающегося

заболевания и оценивает возможность применения веществ для коррекции возникающих осложнений.

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, научной базе, уделяющей много внимания решению фундаментальных и прикладных проблем биомедицинской науки, что лишний раз подтверждает значимость проведенной работы.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Представленный объем экспериментальных данных, выполненных на достаточном количестве животных (90 неллинейных крысах-самцах, 60 неллинейных мышах-самцах, 70 мышах-самцах линии C57bl/6J) и выделенных из мышей первичных клеточных линиях (фибробласты сердца крыс, перитонеальные макрофаги и нейтрофилы мышей), их корректная статистическая обработка, четкое описание и анализ позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации обоснованными.

Теоретическая и научно-практическая значимость

Теоретическое значение рецензируемой работы состоит в обосновании поиска среди новых производных 2-оксиндола веществ, влияющих на активность альфа-глюкозидазы и/или GSK3B. Выявлены закономерности структура-активность в исследованном ряду веществ, что позволяет расширить возможности дизайна лекарственных средств с антидиабетической активностью. Практическое значение работы состоит в экспериментальном поиске веществ с заданной активностью и углубленного фармакологического изучения соединений лидеров. Выявлено соединения К-167 и К-248 с ингибирующей GSK3B активностью, для которых изучено влияние на патогенез и осложнения СД2, и производное К-170(1) с

ингибирующей альфа-глюкозидазу активностью и выраженным антигипергликемическим действием при введении дисахаридов. Полученные результаты указывают на целесообразность дальнейшего доклинического изучения соединений с целью разработки новых антидиабетических лекарственных средств.

Полученные данные следует рассматривать как новые, имеющие важное теоретическое и практическое значение.

Структура и оформление работы

Работа изложена на 176 страницах машинописного текста, иллюстрирована 82 рисунками и 23 таблицами. Построение диссертации классическое в соответствии с существующими требованиями. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав, описывающих собственные результаты автора, главы обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, Литературный указатель содержит 15 отечественных и 174 зарубежных источника. Диссертация прекрасно оформлена, написана хорошим литературным языком и легко читается.

В первой главе приведен литературный обзор по теме диссертации. Представлен современный взгляд на проблему сахарного диабета 2 типа, механизмы его возникновения и развития, описана современная информация относительно изученной активности производных 2-оксиндола. Исходя из представленной информации автором выделены возможные мишени действия изучаемых производных - киназа гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидаза. Для приведенных ферментов проанализированы сигнальные каскады, вовлеченные в патогенез СД2, описаны фармакологические свойства веществ с данной активностью.

Во второй главе описаны материалы и методы исследования. Автором использован комплексный подход, вещества изучены на различных моделях в зависимости от стадии исследования: отдельные ферменты, первичные

клеточные линии, животные здоровые и с моделированной патологией. Применен широкий спектр биохимических и иммуноферментных методик с различными способами детекции сигнала. При моделировании сахарного диабета 2 типа использована современная методика содержания животных на высокожировой диете, воспроизводящая многие звенья патогенеза заболевания. Использованные методы адекватны поставленным задачам диссертации. Количество животных, использованных в экспериментах, позволяет получить достоверные результаты. Проведена статистическая обработка результатов.

Материалы собственных исследований изложены в главах 3 и 4.

В третьей главе описано влияние изучаемых соединений на активность киназы гликогенкиназы типа 3 бета, молекулярного докинга активных производных в фермент и взаимосвязь химической структуры и ингибирующей активности: большую активность проявили производные 3-арилиден-2-оксиндола содержащие в положении С3 (R1) шестичленный ароматический цикл с гетероатомом в орто-положении или гидроксильной группой в пара-положении. Выявлены соединения лидеры К-167 и К-248.

Для производного К-167 показана выраженная антигипергликемическая активность при однократном и при хроническом пероральном введении животным с экспериментальным СД2 в дозе 30 мг/кг. При хроническом введении соединение К-167 восстанавливает показатели углеводного и липидного обменов, а также препятствует развитию хронического подострого воспаления и оксидативного стресса, что особо важно для предотвращения прогрессирования СД2. Противовоспалительная активность вещества подтверждена при стимулировании первичных перитонеальных макрофагов мышей липополисахаридом (снижение синтеза оксида азота, ИЛ-6, отсутствие влияние на фагоцитарные свойства макрофагов, препятствование чрезмерной поляризации), и на животной модели местного воспаления (снижение синтеза оксида азота, ФНО-а). Производное К-167 оказывает антиагрегантную и антитромботическую

активности, что может быть использовано для коррекции осложнений СД2. По результатам исследования острой токсичности соединение К-167 отнесено к 5 классу токсичности и имеет низкую цитотоксичность.

Вещество К-248 при хроническом пероральном введении оказывает выраженную антидиабетическую и противовоспалительную активность. Для соединения характерен противовоспалительный эффект, препятствование чрезмерной поляризации макрофагов, при отсутствии влияния на врожденный бактериальный ответ, что может быть использовано для предотвращения развития хронического подострого воспаления, характерного для сахарного диабета 2 типа.

В четвертой главе описано влияние изучаемых соединений на активность альфа-глюкозидазы, описана взаимосвязь химической структуры и ингибирующей активности: большую активность проявили производные 3-арилиден-2-оксиндола, содержащие в положении С3 (R1) карбоциклические радикалы с заместителем в пара-положении и амидную группировку в положении С5 (R2 для 3-арил-2-оксиндолов и в положении R3 для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов). Найдено соединение К-170(1) с микромолярной активностью, для которого методом молекулярного докинга описано взаимодействие с аллостерическим сайтом фермента. Пероральное введение производного К-170(1) препятствует развитию гипергликемии в пероральном тесте толерантности к дисахаридам (мальтоза, сахароза), сопоставимо с препаратом сравнения акарбозой (5 мг/кг). Значимого влияния на уровень гликемии в тесте толерантности к глюкозе выявлено не было.

Пятая глава посвящена обсуждению результатов исследования. Описаны и проанализированы полученные результаты скрининговых и углубленных исследований производных К-167, К-248 и К-170(1). Особый интерес представляет одновременное наличие противовоспалительной и антидиабетической активности у соединений К-167 и К-248, что может быть использовано для предотвращения развития отдаленных последствий сахарного диабета 2 типа и хронического подострого воспаления в частности.

При этом у соединений отсутствует влияние на врожденный бактериальный ответ, что подтверждает их благоприятное иммуотропное действие. Для соединения К-170(1) интересным представляется факт влияния на аллостерический центр фермента и хорошего всасывания в ЖКТ, что снижает выраженность побочных эффектов, характерных для данного класса лекарственных средств. Данные вещества можно рекомендовать для проведения расширенного доклинического исследования, как потенциальные противодиабетические агенты.

Диссертация завершается 11 выводами и 3 пунктами практических рекомендаций. Все выводы и практические рекомендации обоснованы и логично сформулированы из основного содержания работы. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключения диссертанта следует признать высокой, что обеспечивается как количественной стороной изученного материала, так и качеством его обработки.

Статистика

Полученные данные корректно обработаны с применением современных методов статистики. Используемые статистические методы позволяют адекватно оценивать полученные результаты: в качестве параметрических критериев использован непарный t-тест; для множественного сравнения использованы однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Даннета; для зависимых измерений применен парный t-тест; в случае ненормального распределения данных использованы U-критерий Манна – Уитни; критерий Краскела – Уоллиса с пост-тестом Данна – для множественного сравнения; для зависимых измерений – критерий Вилкоксона; расчеты концентрационных зависимостей выполнены с использованием линейного и нелинейного регрессионного анализов.

Публикации

Основное содержание диссертационной работы отражено в 11 публикациях, из них 3 в журналах, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени, получен 1 патент на изобретение РФ. Публикации в целом отражают основные результаты, полученные в диссертационной работе.

Автореферат

Основные положения автореферата диссертации полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. Вместе с тем, в ходе рецензирования диссертационной работы возникли следующие вопросы, требующие дополнительного уточнения, но не затрагивающие существа работы:

1. Как известно, киназа гликогенсинтазы 3 представлена двумя изозимами – GSK 3 α и GSK 3 β . В связи с этим в обзоре литературы допущена неточность: автор приводит на рисунках множество схем, заимствованных из других источников, с аббревиатурой GSK 3, а в подписях к рисункам и тексте обсуждает только GSK 3 β .
2. Так как фармакологической мишенью в исследовании была GSK 3 β , известны ли соотношения изоформ фермента в организме человека, крысы и их функциональные особенности? Окажут ли влияние ингибиторы GSK 3 β на другую изоформу?
3. Почему для изучаемых ингибиторов GSK 3 β исследования выполнялись при уровне ингибирования >50%, а для снижающих активность альфа-глюкозидазы веществ – при ингибировании >55%?
4. Почему влияние дексаметазона на синтез ИЛ-6 макрофагами изучено только в одной концентрации?

5. В ряде тестов *in vivo* исследуемые вещества вводили животным в 10% растворе ДМСО – известного пенетрирующего агента, способного повлиять на биодоступность растворенного вещества, его максимальную концентрацию в крови и время ее достижения, следовательно, на эффективность. В то же время, препараты сравнения (метформин, вилдаглиптин, целекоксиб) вводили без ДМСО. Насколько объективно при таком протоколе сравнение эффективности?

В тексте встречаются опечатки, повторы в перечислении материалов исследования, отсутствует разъяснение уровня значимости различий на рисунках (не ясно, чем отличаются значения, отмеченные *, **, *** или **** и т.п.).

Заключение

Диссертационная работа Клочкова Владлена Геннадиевича на тему: «Фармакологические свойства новых производных 2-оксиндола», выполненная под научным руководством академика РАН профессора д.м.н. А.А. Спасова и представленная к защите на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология, является завершенной, самостоятельно выполненной научной квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи в области экспериментальной и клинической фармакологии, состоящей в поиске и углубленном фармакологическом изучении новых производных 2-оксиндола с антидиабетической активностью, что имеет большое значение для фармакологии. Работа полностью соответствует паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (п.4 «Исследование взаимодействий между организмом и лекарственными средствами, изучение их фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма»). Научная новизна и практическая значимость результатов исследования позволяют утверждать,

что данная работа соответствует п.9 Положения ВАК Министерства образования РФ, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, о порядке присуждения ученых степеней на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а её автор, Клочков Владлен Геннадиевич, по своей эрудиции, компетенциям, научному и практическому опыту достоин присуждения искомой степени.

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой
фармацевтической химии,
фармакогнозии и организации
фармацевтического дела факультета
фундаментальной медицины ФГБОУ ВО
«Московский государственный
университета имени М.В. Ломоносова»,
доктор фармацевтических наук,
профессор



Каленикова Елена Игоревна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1
Тел: +7 (495) 939-10-00, E-mail: info@rector.msu.ru
www.msu.ru

«31» января 2022 года

Подпись Е.И.Калениковой подтверждаю

Декан Факультета фундаментальной медицины
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
Академик РАН



Всеволод Арсеньевич Ткачук

СОГЛАСИЕ ОППОНЕНТА

Я, Каленикова Елена Игоревна, доктор фармацевтических наук по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», даю свое согласие выступить в качестве официального оппонента по диссертации Клочкова Владлена Геннадиевича «Фармакологические свойства новых производных 2-оксиндола», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология.

Членом экспертного совета ВАК не являюсь.

О месте и дате защиты информирован.

"_09_" __ноября__ 2021 г.



Подпись доктора фармацевтических наук, профессора Елены Игоревны Калениковой подтверждаю.

Декан факультета фундаментальной медицины
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Академик РАН



Ткачук В.А.



119991 г. Москва, Ленинские горы, д. 1
Тел.: +7 (495) 939-10-00
Адрес электронной почты:
info@rector.msu.ru

Сведения об официальном оппоненте

по диссертации Ключкова Владлена Геннадиевича «Фармакологические свойства новых производных 2-оксиндола», на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.3.6 - Фармакология, клиническая фармакология

Ф.И.О. оппонента	Каленикова Елена Игоревна
Учёная степень	доктор фармацевтических наук
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология
Ученое звание	профессор
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Занимаемая должность	Заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины
Почтовый индекс, адрес	119991 г. Москва, Ломоносовский проспект, д.27, корп. 1
Телефон	(495) 932 88 14 тел./факс: (499) 726 55 47
Адрес электронной почты	eikaleni@fbm.msu.ru eikaleni@yandex.ru
Список основных публикаций официального оппонента по профилю диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pharmacokinetics and tissue distribution of oxidized and reduced coenzyme Q10 upon intravenous administration / Kalenikova E.I., Gorodetskaya E.A., Obolenskaya O.N., Shapavo N.S., Makarov V.G., Medvedev O.S. // Pharmaceutical Chemistry Journal.– 2021.– Т. 55.– № 7.– С. 633-63. 2. Intravenous administration of Coenzyme Q10 in acute period of cerebral ischemia decreases mortality by reducing brain necrosis and limiting its increase within 4 days in rat stroke model / Obolenskaya O.N., Gorodetskaya E.A., Kalenikova E.I., Belousova M.A., Gulyaev M.V., Makarov V.G., Pirogov Yu A., Medvedev O.S. // ANTIOXIDANTS. – 2020. – том 9. – № 12. – С. 1-17. 3. Метаболические маркеры и окислительный стресс в патогенезе ожирения у детей / О. В. Поварова, Е. А. Городецкая, Е. И. Каленикова, О. С. Медведев // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65. – № 1. – С. 22-29. 4. Роль антиоксидантов в комплексной терапии пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием / Хатламаджиян М.Г., Харитоновна Е.В., Щербакова Л.Н., Каленикова Е.И., Медведев О.С., Алексеенкова М.В., Панина О.Б. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.– 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 22-27. 5. The Generation of Superoxide Radicals by Cardiac Mitochondria and the Antioxidant Effect of the Water-

	<p>Soluble Form of Ubiquinol-10 / Dudylina A.L., Ivanova M.V., Kalatanova A.V., Kalenikova E.I., Makarov V.G., Makarova M.N., Shumaev K.B., Ruuge E.K. // Biophysics. – 2019. – Т. 64. – № 2. – С. 203-208.</p> <p>6. Preclinical study of the pharmacokinetics of a new intravenous dosage form of ubiquinol / Kalenikova E.I., Gorodetskaya E.A., Kulyak O.Yu, Kozaeva L.P., Makarov V.G., Pozharitskaya O.N., Shikov A.N., Medvedev O.S. // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2018. – Т. 51. – № 11, с. 949-953.</p> <p>7. Оценка кардиопротекторной эффективности инновационной лекарственной формы убихинола для внутривенного введения / О. Ю. Куляк, Е. А. Городецкая, Е. И. Каленикова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81. – № 4. – С. 8-11.</p> <p>8. Tissue-Level Dynamics and Redox State of Coenzyme Q10 in Rats After Intravenous Injection of Ubiquinol / Kalenikova E.I., Gorodetskaya E.A., Obolenskaya O.N., Shapoval N.S., Makarov V.G., Medvedev O.S. // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2018. – Т. 52. – № 8. – С. 690-693.</p> <p>9. Маркеры системы антиоксидантной защиты в диагностике наружного генитального эндометриоза у пациенток с бесплодием / Хатламаджиян М.Г., Харитоновна Е.В., Анисимова У.С., Щербакова Л.Н., Бугеренко А.Е., Каленикова Е.И., Панина О.Б. // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва. – 2018. – Т. 5. – № 2. – С. 97-10.</p> <p>10. Убихинол как терапевтическое средство: результаты экспериментальных и клинических исследований / Каленикова Е.И., Городецкая Е.А., Оболенская О.Н., Куляк О.Ю., Артемьева М.М., Медведев О.С. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80. – № 11. – С. 39-42.</p> <p>11. Beneficial effect of coenzyme Q₁₀ injection on nitric oxide-related dilation of the rat aorta / L. P. Kozaeva, E. A. Gorodetskaya, E. I. Kalenikova [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2017. – Vol. 794. – P. 15-19.</p>
--	---

Официальный оппонент



Каленикова Е.И.

Подпись Калениковой Е.И. подтверждаю
 Декан факультета фундаментальной медицины
 Федерального государственного бюджетного
 образовательного учреждения высшего образования
 «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
 Академик РАН




Ткачук В.А.

"_09_" __ноября__ 2021 г.