

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего лабораторией психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» Ворониной Татьяны Александровны на диссертацию Бабкова Дениса Александровича на тему «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства», представленной к защите на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность проблемы

Диссертационная работа Д.А. Бабкова посвящена решению актуальной научно-практической проблемы поиска и изучения фармакологических свойств новых соединений для лечения сахарного диабета 2 типа (СД2). Воздействие на выбранные фармакологические мишени может служить новым методом терапии СД2 и профилактики его осложнений, что является весьма актуальным направлением в поиске новых фармакологически активных соединений. Выбранное направление исследований относится к современным глобальным проблемам фармакологии, поскольку направлено на терапию социально значимого заболевания, в то время как разнообразие разработанных классов противодиабетических препаратов, к сожалению, не удовлетворяет всем необходимым потребностям практической диабетологии. По своему характеру работа представляет собой фундаментальное исследование, направленное на решение актуальной научной проблемы – создание нового поколения препаратов для лечения СД2 как социально-значимого заболевания.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Представленный объем экспериментальных данных, полученных на достаточном количестве животных (180 нелинейных крысах-самцах, 200 нелинейных мышах-самцах, 150 мышах-самцах C57bl/6J и 5 кроликах-самцах породы шиншилла), а также первичных клеточных линиях (фибробласты сердца крысы, перитонеальные макрофаги мыши), их правильный статистический анализ, четкое описание и анализ позволяют квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные. Выводы, рекомендации и практические следствия, изложенные в этой работе, хорошо обоснованы.

Научная новизна и практическая ценность диссертации

Диссертационная работа имеет высокую степень научной новизны. В диссертации продемонстрирована возможность плеiotропного воздействия на ключевые звенья патогенеза сахарного диабета 2 типа посредством GSK3B, PTP1B, AMPK и GSK-опосредованной регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов и метаболических путей и идентифицированы новые фармакологически активные соединения, обладающие потенциалом для дальнейших доклинических исследований.

Было обнаружено, что соединение К-167 является наномолярным ингибитором GSK3B, нецитотоксичным и проявляет плеiotропную противодиабетическую активность на животной модели диабета 2 типа. Он нормализует гиперинсулинемию, снижает резистентность к инсулину, улучшает толерантность к глюкозе, снижает массу

висцеральной жировой ткани и уровень триглицеридов в печени, корректирует маркеры системного воспаления и оказывает выраженное антитромботическое действие.

Соединения ВIF-68 и ВIF-69 являются субмикромольными активаторами АМПК и ингибируют стимулированный LPS синтез оксида азота макрофагами с низкой цитотоксичностью, но не проявляют гипогликемической активности *in vivo*.

Соединение АZH-141a является микромольным ингибитором РТР1В и активатором АМПК, проявляющим плеiotропную противодиабетическую активность на животной модели диабета 2 типа. Он улучшает толерантность к глюкозе и гликемию натощак, а также корректирует липидный гомеостаз за счет снижения концентрации общего холестерина и липопротеидов низкой плотности в плазме крови, массы висцеральной жировой ткани и массы тела животных.

Было установлено, что соединение NP-0006 является микромольным активатором GCK и проявляет плеiotропную противодиабетическую активность на животной модели диабета 2 типа. Он уменьшает гиперинсулинемию, резистентность к инсулину, улучшает толерантность к глюкозе, ингибирует глюконеогенез, восстанавливает синтез гликогена, снижает массу тела животного за счет уменьшения массы забрюшинной и брыжеечно-висцеральной жировой ткани и корректирует маркеры системного воспаления. NP-0006 увеличивает пролиферативную активность эндокринных клеток в островках Лангерганса в поджелудочной железе мышей с экспериментальным диабетом 1 типа.

В диссертации разработана методология поиска новых антидиабетических соединений, которая включает последовательное изучение *in silico*, *in vitro* и *in vivo*. Эта методология позволяет эффективно выявлять новые активные соединения с благоприятными фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками. Виртуальный скрининг был проведен на 2309 структур, из которых 303 были отобраны для экспериментального изучения. Эффективность этой системы поиска была подтверждена выявлением новых химических классов и скаффолдов ингибиторов GSK3В и РТР1В, активаторов АМПК и GCK.

Теоретическая и научно-практическая значимость

Диссертационная работа Д.А. Бабкова имеет теоретическое значение в части разработки оригинальной методологии комплексного мишень-ориентированного поиска новых противодиабетических соединений с последовательными исследованиями *in silico*, *in vitro* и *in vivo*. Такой подход эффективно приоритизирует как мишени фармакологического воздействия, так и новые биологически активные соединения с благоприятными характеристиками. Практическая ценность работы заключается в открытии новых фармакологически активных соединений. Исследование показывает, что 3-арилиден-2-оксиндолы являются многообещающим каркасом для поиска и разработки ингибиторов GSK3В. Кроме того, было обнаружено, что 2'-циано-бифенилконъюгированные бензимидазо[1,2-а]имидазолы являются перспективными для поиска активаторов АМПК. Исследование также показало, что бифенилзамещенные 2-аминобензимидазолы и 2-иминобензимидазолы являются многообещающей основой для поиска новых ингибиторов РТР1В. Кроме того, соединения бис-пиридоксина с серинсодержащим алифатическим линкером были идентифицированы как новый и

многообещающий каркас для поиска и разработки активаторов GSK. Была продемонстрирована противодиабетическая активность наиболее перспективных соединений, а также их потенциал для регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов для лечения метаболических нарушений, связанных с сахарным диабетом 2 типа. Исследование также устанавливает потенциал для поиска полифункциональных противодиабетических соединений. Всестороннее изучение фармакологических свойств наиболее эффективных соединений подтверждает потенциал доклинических исследований соединения-ингибитора GSK3B K-167, соединения-ингибитора РТР1В/активатора АМПК AZH-141a и соединения-активатора GSK NP-0006. Эти результаты закладывают основу для разработки препаратов с оригинальным механизмом действия для улучшения лечения социально значимых заболеваний.

Структура и оформление работы

Работа изложена на 237 страницах машинописного текста, иллюстрирована 72 рисунками и 28 таблицами. Построение диссертации классическое в соответствии с существующими требованиями. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав, описывающих собственные результаты автора, главы обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Литературный указатель содержит 12 отечественных и 448 зарубежных источников. Диссертация хорошо оформлена, написана хорошим литературным языком и легко читается.

В первой главе диссертации представлен обзор литературы по теме сахарного диабета 2 типа. В нем представлен современный взгляд на этиологию и патогенез сахарного диабета 2 типа, а также современные фармакотерапевтические подходы. Особое внимание уделяется проблеме функциональной потери β -клеток и сдвигу в парадигме лечения сахарного диабета 2 типа от контроля гликемии к защите (обеспечению секреторного покоя) и стимуляции регенерации β -клеток. Также обсуждаются проблемы разработки современных лекарственных средств и решения, предлагаемые хемоинформатикой и другими информационными технологиями.

Во второй главе описываются материалы и методы, использованные в исследовании. Автор применил комплексный подход, изучая вещества на различных моделях в зависимости от стадии исследования: отдельные ферменты, первичные клеточные линии, здоровые животные и животные с имитируемой патологией. Был применен широкий спектр методов биохимического и иммунологического анализа с различными методами обнаружения сигналов. При моделировании диабета 2 типа использовалась современная методика содержания животных на диете с высоким содержанием жиров, воспроизводящая ключевые звенья патогенеза заболевания. Используемые методы соответствуют целям диссертации. Количество животных, использованных в экспериментах, позволяет получить достоверные результаты, и была проведена соответствующая статистическая обработка результатов.

Материалы собственных исследований изложены в главах с третьей по седьмую.

В третьей главе диссертации представлена разработанная система для целенаправленного поиска противодиабетических соединений. Представлен

методологический подход к оценке и приоритизации целей разработки инновационных лекарственных средств, который использует комплекс геномных, протеомных, экспериментальных и клинических данных. В результате были выбраны четыре инновационные антидиабетические мишени - гликогенсинтазокиназа 3β (GSK3B), протеин-тирозинфосфатаза 1B (PTP1B), АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) и глюкокиназа (GCK). Подробно описана технология отбора соединений для экспериментальных исследований с учетом критериев сходства с лекарственным средством и маркеров токсичности субструктуры.

В четвертой главе представлены результаты экспериментального скрининга ингибиторов GSK3B и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Скрининг библиотеки соединений выявил многообещающий каркас ингибиторов GSK3B - 2-оксиндолы, 16 из которых проявляли субмикромольную активность, причем 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (K-167) был наиболее активным. Соединение K-167 подтвердило свою антигипергликемическую, противодиабетическую, антитромботическую активность и низкую острую токсичность в исследованиях на животных моделях.

В пятой главе представлены результаты экспериментального скрининга активаторов АМРК и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. В экспериментальном исследовании было протестировано 83 соединения, и было обнаружено, что 36 из них активируют человеческий АМРК на 50% и более при концентрации 10 мкм. Наибольшая активность была обнаружена у 2'-циано-дифенилзамещенных конденсированных производных бензимидазола, и увеличение размера гетероциклического ядра положительно коррелировало с активацией АМРК. Затем два наиболее активных соединения (BIF-68 и BIF-69) были протестированы на воспалительную активацию перитонеальных макрофагов, где они ингибировали синтез оксида азота с IC_{50} около 5 мкм и низкой цитотоксичностью. Несмотря на их высокую активность *in vitro*, BIF-69 и другие идентифицированные активаторы не проявляли гипогликемической активности, вероятно, из-за плохой проницаемости клеточных мембран, но они являются ценной отправной точкой для дальнейшей оптимизации и разработки новых активаторов АМРК с антидиабетической активностью.

В шестой главе представлены результаты экспериментального скрининга ингибиторов PTP1B и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Скрининг сфокусированной библиотеки из 51 соединения выявил 12 активных ингибиторов PTP1B с активностью в микромольном диапазоне. Из двух ведущих соединений, AZH-141a и BIF-10, AZH-141a не только ингибирует PTP1B, но и активирует АМРК. AZH-141a проявлял гипогликемический эффект при введении крысам и улучшал толерантность к глюкозе, массу тела и липидный профиль крови. Полученные результаты подтверждают концепцию о том, что модулирование активности нескольких терапевтических мишеней при сахарном диабете 2 типа может оказывать значительный плейотропный противодиабетический эффект.

В седьмой главе обсуждаются результаты экспериментального скрининга активаторов GCK и исследования фармакологической активности наиболее

перспективных соединений. Скрининг целенаправленной библиотеки соединений выявил 27 соединений в качестве активаторов GSK с эффективностью 21,3%. Значения EC50 идентифицированных соединений варьировались от 19 до 82 мкм. Был идентифицирован новый класс активаторов GSK, биспиридоксиновых соединений, причем наибольшую активность проявляют NP-0001, NP-0006, NP-0061 и NP-0063. Наиболее активные соединения обладали благоприятными фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками, при этом цитотоксичность до 250 мкм не наблюдалась. Дальнейшая оценка показала, что NP-0001 не был эффективен при пероральном или внутрибрюшинном введении в дозах до 300 мг/кг, в то время как NP-0006 улучшал толерантность к глюкозе, не вызывая гипергликемии, в дозах 300 и 500 мг/кг при внутрибрюшинном введении. NP-0006 также нормализовал содержание гликогена в печени, увеличил активность GSK на 78,4% и снизил массу тела у мышей DIO-C57bl/6j при внутрибрюшинном введении. Его низкая острая токсичность делает его многообещающим кандидатом для дальнейшей оптимизации, учитывая его ценную способность стимулировать регенерацию β -клеток поджелудочной железы у мышей с диабетом.

Восьмая глава посвящена обсуждению результатов исследования. Показана важность терапевтических стратегий, направленных на сохранение функций и сохранение массы β -клеток. Обоснована перспективность фармакологического воздействия на киназные каскады для коррекции метаболических нарушений, связанных с инсулинорезистентностью, и противодействия системному воспалению и метавоспалению, а также поддержанию или восстановлению функциональной массы β -клеток, т.е. плейотропному воздействию на ключевые факторы и звенья патогенеза СД2. Обоснована необходимость рационального выбора мишеней для разработки ЛС, предложенная технология мишень-ориентированного поиска сопоставлена с аналогичными подходами. Обобщены и обсуждены в сравнении с литературными данными результаты изучения антидиабетической активности соединений-лидеров.

Выводы и практические рекомендации соответствуют поставленным целям и задачам исследования. 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.

Автореферат диссертации адекватно отражает основное содержание диссертационного исследования, полностью соответствует разделам, положениям и выводам диссертации.

Основное содержание диссертационной работы отражено в 16 публикациях в журналах из Перечня ВАК РФ, в том числе, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Ключевые результаты работы защищены 6 патентами на изобретение РФ. Публикации отражают основные результаты, полученные в диссертационной работе.

Вопросы и замечания

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

1. В работе выбран ряд инновационных мишеней при лечении сахарного диабета. Наиболее изучена в клинических исследованиях глюкокиназа. Тем не менее, препараты класса активаторов глюкокиназы до сих пор не применяются в клинике. Каковы причины? Можно ли рассматривать эту мишень как перспективную?
2. Существует целый ряд алиментарных моделей сахарного диабета. Почему в качестве основной в работе была выбрана именно модель с высокожировой диетой, а не, например, высокоуглеводной диетой?
3. Почему в острых экспериментах исследуемые вещества вводили внутривентриально, если, согласно расчетам ADMET, сделан вывод о возможности перорального приема?
4. Дозы в 300 и 5000 мг/кг NP-006 при внутривентриальном введении представляются слишком высокими для рассмотрения вещества как потенциального кандидата для клинических исследований. Каковы его преимущества перед препаратом сравнения и дальнейшие перспективы?

Заключение

Диссертационная работа Дениса Александровича Бабкова на тему: «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства» на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение актуальной научной проблемы, имеющей важное значение для фармакологии – разработке системы мишень-ориентированного поиска соединений-регуляторов активности киназ, обладающих комплексными антидиабетогенными свойствами – снижающими периферическую инсулинорезистентность и системное воспаление, стимулирующих пролиферацию β -клеток поджелудочной железы, нормализующих метаболизм глюкозы и липидов в условиях СД2. По актуальности, научной новизне, практической значимости и методическому уровню диссертация Д.А. Бабкова соответствует паспорту специальности 3.3.6. — фармакология, клиническая фармакология и удовлетворяет всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. (в редакции Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Денис Александрович Бабков заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» Татьяна Александровна Воронина.

Подпись д.м.н., профессора, Заслуженного деятеля науки РФ Т.А. Ворониной заверяю: Ученый секретарь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»,

кандидат биологических наук

« 15 » мая 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова». 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8, тел.: 8(499)151-18-81, e-mail: zakusovpharm@mail.ru

**Сведения об официальном оппоненте
по диссертации Бабкова Дениса Александровича «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства», на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология**

Ф.И.О. оппонента	Воронина Татьяна Александровна
Учёная степень	доктор медицинских 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 научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»
Занимаемая должность	Заведующая лабораторией психофармакологии
Почтовый индекс, адрес	125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8
Телефон	+7 (499) 151-18-81
Адрес электронной почты	tavoronina@comtv.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. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Воронина Т.А. Этилметилгидроксипиридина сукцинат индуцирует противовоспалительную поляризацию микроглии в мозге стареющих крыс // Биологические мембраны. – 2022. – Т. 39. – № 1. – С. 44-53. 2. Иванова Е.А., Васильчук А.Г., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. Влияние комбинированного применения мексидола с диклофенаком натрия на выраженность экссудативного воспаления у крыс при превентивном десятидневном пероральном введении // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2022. – № 1. – С. 14-19. 3. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Воронина Т.А. Сигнальная система сукцинат/sucnr1 индуцирует противовоспалительную поляризацию микроглии в мозге стареющих крыс / В сборнике: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Под редакцией А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Пушино, 2021. – С. 680-687. 4. Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А. Способность мексидола усиливать антиэкссудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у

	<p>крыс и мышей // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. –2021. –Т. 76. № 2. –С. 61-66.</p> <p>5. Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А. Противовоспалительные свойства гимантана в лекарственной форме для наружного применения на моделях каррагенанового и декстрансульфатного отеков у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. –2020. –Т. 83. –№ 5. –С. 29-32.</p> <p>6. Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Позднев В.Ф., Воронина Т.А. Активность дипептидилпептидазы iv при экссудативном воспалении у грызунов // Патогенез. –2018. –Т. 16. –№ 1. –С. 51-57.</p> <p>7. Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Алексеева С.В., Качалов К.С., Воронина Т.А. Сравнение выраженности воспаления у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на инъекцию полного адьюванта Фрейнда // Биомедицина. –2019. –Т. 15. –№ 2. –С. 75-87.</p>
--	---

Официальный оппонент



Т.А. Воронина

28 декабря 2022 г.

Подпись доктора медицинских наук, профессора Ворониной Татьяны Александровны подтверждаю.

Ученый секретарь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», к.б.н.



В.А. Крайнева

В диссертационный совет
21.02.005.02 при ФГБОУ ВО
«Волгоградский государственный
медицинский университет»
Минздрава России (400131, г.
Волгоград, пл. Павших Борцов, 1)

СОГЛАСИЕ ОППОНЕНТА

Я, Воронина Татьяна Александровна, доктор медицинских наук по специальности 14.03.06–Фармакология, клиническая фармакология, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», даю свое согласие выступить в качестве официального оппонента по диссертации Бабкова Дениса Александровича на тему «Мишень-ориентированный поиск антидиабетических соединений и их фармакологические свойства», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология.

Членом экспертного совета ВАК не являюсь.

Совместных публикаций с диссертантом не имею.

Согласна на включение моих персональных данных в аттестационное дело и их дальнейшую обработку.

О месте и дате защиты информирована.

"_28_"_декабря__2022 г.



Подпись доктора медицинских наук, профессора Ворониной Татьяны Александровны подтверждаю.

Ученый секретарь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», к.б.н.



В.А. Крайнева

125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8
Тел.: +7 (499) 151-18-81
Адрес электронной почты:
zakusovpharm@mail.ru