

## **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 аналитика 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  $\beta$ -клеток и сдвигу в парадигме лечения сахарного диабета 2 типа от контроля гликемии к защите (обеспечению секреторного покоя) и стимуляции регенерации  $\beta$ -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 - гликогенсинтазакиназа  $3\beta$  (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 внутривнутрибрюшинном 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 внутривнутрибрюшинном 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 внутривнутрибрюшинном введении. Его низкая острая токсичность делает его многообещающим кандидатом для дальнейшей оптимизации, учитывая его ценную способность стимулировать регенерацию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы у мышей с диабетом.

Восьмая глава посвящена обсуждению результатов исследования. Показана важность терапевтических стратегий, направленных на сохранение функций и сохранение массы  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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"> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>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</li> </ol>



	<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