

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ Покровского Михаила Владимировича 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**

Диабет и его отдаленные последствия являются одной из ведущих причин ранней инвалидности и смертности. Распространенность сахарного диабета продолжает расти как в России, так и во всем мире, в первую очередь из-за сахарного диабета 2 типа. Несмотря на использование в клинической практике 11 классов противодиабетических препаратов, они могут лишь замедлить развитие диабета 2 типа и обладают ограниченной способностью корректировать резистентность к инсулину. Даже пациентам, придерживающимся адекватной комбинированной антигипергликемической терапии, не удается достичь целевого уровня гликированного гемоглобина. Новые методы лечения, направленные на восстановление активности сигнальных путей инсулина, борьбу с системным воспалением и защиту эндокринных клеток поджелудочной железы, могут помочь решить важные проблемы в терапии диабета. Разработка новых противодиабетических препаратов, а также профилактика и лечение отдаленных последствий сахарного диабета является актуальной задачей, которая может значительно улучшить качество жизни пациентов и снизить социальные и экономические потери, связанные с растущей распространенностью сахарного диабета.

### **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

В работе приведен большой объем экспериментальных данных, полученных на достаточном количестве животных (180 нелинейных крысах-самцах, 200 нелинейных мышцах-самцах, 150 мышцах-самцах C57bl/6J и 5 кроликах-самцах породы шиншилла) и первичных клеточных линиях (фибробласты сердца крысы, перитонеальные макрофаги мыши), их правильный статистический анализ, четкое описание и аналитика позволяют нам квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные. Сформулированные выводы и рекомендации хорошо обоснованы. Полученные данные следует рассматривать как новые и имеющие значительную теоретическую и практическую ценность.

### Новизна и практическая ценность диссертации

Была продемонстрирована возможность плейотропного воздействия на ключевые звенья патогенеза сахарного диабета 2 типа посредством GSK3B, PTP1B, AMPK и GSK-опосредованной регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов и метаболических путей. Были идентифицированы новые фармакологически активные соединения, обладающие потенциалом для дальнейших доклинических исследований.

Было обнаружено, что соединение K-167 является наномолярным ингибитором GSK3B, нецитотоксичным и проявляет плейотропную 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 BIF-68 и BIF-69 являются субмикромольными активаторами AMPK и ингибируют стимулированный LPS синтез оксида азота макрофагами с низкой цитотоксичностью, но не проявляют гипогликемической активности *in vivo*.

Соединение AZH-141a является микромольным ингибитором PTP1B и активатором AMPK, проявляющим плейотропную 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 GSK и проявляет плейотропную 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.

Была 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 GSK3B и PTP1B, активаторов AMPK и GSK. Наиболее перспективные вещества были доказаны иметь антидиабетическую активность и могут быть использованы для создания новых лекарственных препаратов.

### Теоретическая и научно-практическая значимость

Предложена новая методология целенаправленного поиска новых противодиабетических соединений, которая включает исследования *in silico*, *in vitro* и *in vivo*

для эффективного выявления соединений с благоприятными фармакокинетическими и токсикологическими характеристиками. Система позволяет выявить приоритетные валидированные биологические мишени и использует методы хемоинформатики для отбора соединений для экспериментальной проверки. Был проведен виртуальный скрининг 2309 структур, и 303 выбранных соединения были экспериментально изучены на предмет их воздействия на 4 белка-мишени. Были идентифицированы новые химические классы и каркасы ингибиторов GSK3B и PTP1B, активаторов AMPK и GSK. Была продемонстрирована противодиабетическая активность наиболее перспективных соединений и установлена их способность регулировать внутриклеточные сигнальные пути. Также был продемонстрирован потенциал разработки полифункциональных противодиабетических соединений. Было обосновано доклиническое исследование ингибитора GSK3B, производного 2-оксиндола K-167, ингибитора PTP1B/активатора AMPK 2-иминобензимидазола AZH-141a и активатора GSK, производного пиридоксина NP-0006. Заложена основа для создания препаратов с оригинальным механизмом действия для улучшения лечения социально значимых заболеваний. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта 14-25-00139 «Создание системы мишень-ориентированного поиска биологически активных соединений, влияющих на патогенетически важные звенья нарушения углеводного обмена при сахарном диабете типа 2; с использованием технологий компьютерного моделирования и медицинской химии».

#### Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационное исследование соответствует п.3. Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, генной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, п.4. Исследование зависимости «структура–активность» в различных классах фармакологических веществ. Целенаправленный синтез и скрининг фармакологических веществ, п.5. Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток, п.6. Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека, п.7. Экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности лекарственных средств. Изучение токсичности при однократном и многократном введении, включая оценку специфической токсичности и нежелательных побочных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на репродуктивную функцию, аллергизирующее действие, иммунотоксичность и канцерогенность) паспорта специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология.

### **Полнота освещения результатов диссертации в печати**

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.

### **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 **главе 1** рассмотрены современные подходы к лечению сахарного диабета 2-го типа, включая проблему потери функциональной активности  $\beta$ -клеток. Описаны проблемы, связанные с разработкой лекарственных средств, и предложены пути их решения с помощью хемоинформатики и других информационных технологий. Представлена современная методология поиска антидиабетических соединений, включающая виртуальный скрининг, экспериментальное исследование и предварительные клинические испытания.

Во **главе 2** описываются материалы и методы исследования, включая объекты изучения - 2309 низкомолекулярных соединений, используемые методы расчета характеристик лекарственного подобия, токсичности и фармакокинетических свойств и молекулярного подобия, а также методы виртуального скрининга. Отобранные соединения были исследованы в микропланшетном формате как ингибиторы GSK3 $\beta$ , ингибиторы RTP1 $\beta$ , активаторы АМРК или активаторы GSK, а также на их цитотоксичность, влияние на захват глюкозы фибробластами и воспалительную активацию макрофагов. Исследования проводились на моделях сахарного диабета 2-го типа в мышцах C57bl/6j с ожирением, вызванным высокожировой диетой (ВЖД) и нелинейных крысах, получавших ВЖД в сочетании с введением стрептозотоцина (STZ). Эффекты соединений на углеводный и жировой обмен, а также на пролиферацию  $\beta$ -клеток и острое токсическое действие исследовались на мышцах.

В **главе 3** описывается система мишень-ориентированного поиска антидиабетических соединений, которая основывается на оценке и приоритизации инновационных мишеней разработки лекарственных средств. Были валидированы четыре антидиабетические мишени, и разработана технология отбора соединений для экспериментального исследования с учетом критериев лекарственного подобия и токсичности. Для поиска наиболее активных ранее описанных низкомолекулярных ингибиторов или активаторов выбранных мишеней использовалась публичная база данных ChEMBL. Были выявлены активные соединения, которые служили основой для

формулирования закономерностей структура-активность и выбора соединений для дальнейшей валидации на клеточных и животных моделях. Оценка расчетных параметров фармакокинетики и безопасности соединений-лидеров, а также экспериментальное определение острой токсичности проводилась для выбранных соединений. Фармакологическую активность оценивали на животных моделях сахарного диабета с определением мишень-специфических аспектов влияния на  $\beta$ -клетки и маркеры углеводного и жирового обмена.

В главе 4 описываются результаты экспериментального скрининга ингибиторов GSK3 $\beta$  и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Выявлен перспективный скаффолд ингибиторов GSK3 $\beta$  – 3-арилиден-2-оксиндолы. Из 42 испытанных соединений выявлено 16 ингибиторов GSK3 $\beta$ , из них 4 – с субмикромольной активностью. Наиболее активное соединение 3-(2-пиридинилметил)-2-оксиндол (K-167) показало IC<sub>50</sub> 4,19 нМ. Изученные ингибиторы GSK3 $\beta$  показали низкую цитотоксичность. K-167 было выбрано как соединение-лидер для дальнейшего изучения при длительном введении мышам с СД2. При 3-месячном пероральном введении в дозе 30 мг/кг K-167 показало выраженную плеiotропную антидиабетическую активность, сопоставимую или превосходящую эффект метформина в дозе 150 мг/кг. K-167 также оказало антитромботическое действие и не является токсичным.

В главе 5 описываются результаты экспериментального скрининга активаторов АМРК и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Выявлено 36 соединений, которые активировали рекомбинантную АМРК человека на 50% и более. Наибольшая активность была у 2'-карбонитрил-дифенил-замещенных конденсированных производных бензимидазола.

В главе 6 описываются результаты экспериментального скрининга ингибиторов РТР1 $\beta$  и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Выявлено 12 активных соединений, подавлявших специфическую активность РТР1 $\beta$  на 50% и более. Наиболее активные соединения являются бифенильными производными 2-иминобензимидазола. Одно из наиболее активных соединений AZH-141a является не только ингибитором РТР1 $\beta$ , но и микромольным активатором АМРК. При исследовании антидиабетической активности на животных выявлено, что AZH-141a обладает гипогликемическим эффектом при однократном введении intactным крысам в дозе 300 мг/кг перорально и при 21-дневном введении крысам с ожирением и экспериментальным СД2 в дозе 30 мг/кг.

В главе 7 описываются результаты экспериментального скрининга активаторов GSK и изучения фармакологической активности наиболее перспективных соединений. Выявлено 27 соединений, валидированных как активаторы GSK, с величинами EC<sub>50</sub> в диапазоне 19 мкМ – 82 мМ. Новый класс активаторов GSK – биспиридоксиновые соединения – обладает наибольшей активностью среди всех выявленных соединений. Прогноз фармакокинетических и токсикологических характеристик наиболее активных соединений показал высокую степень безопасности и благоприятные физико-химические свойства. Оценка их влияния на жизнеспособность макрофагов мышей и фибробласты крыс показала отсутствие цитотоксичности до концентрации 250 мкМ. Оценка антидиабетической

активности соединения NP-0006 на животных показала его способность повышать активность ГСК печени, нормализовать содержание гликогена печени и улучшать толерантность к глюкозе без развития гипогликемии. Однако, соединение NP-0006 снижало массу тела животных, находящихся на высокожировой диете, и было ассоциировано с повышением содержания триглицеридов в печени. В эксперименте было выявлено, что NP-0006, как и метформин, улучшает иммунный статус животных, снижая маркеры хронического подострого воспаления и восстанавливая нормальное содержание лимфоцитов при падении уровня циркулирующих иммунных комплексов до нормальных значений. Также было показано, что NP-0006 стимулирует процессы пролиферации  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, увеличивая их количество и снижая количество глюкагон-продуцирующих клеток. Введение NP-0006 также приводило к росту числа внеостровковых  $\beta$ -клеток в ацинарной ткани поджелудочной железы и рядом с панкреатическими протоками в 5,6 раза.

В **обсуждении** отмечены ключевые результаты работы – были выявлены положительные эффекты NP-0006 на иммунный статус животных и стимуляция процессов пролиферации  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. В обсуждении отмечается важность сохранения функций и массы  $\beta$ -клеток, а также перспективность фармакологического воздействия на киназные каскады для коррекции метаболических нарушений и противодействия системному воспалению. Обсуждается необходимость рационального выбора мишеней для разработки лекарств и технология мишень-ориентированного поиска. Результаты изучения антидиабетической активности соединений-лидеров сравниваются с литературными данными.

Диссертация завершается выводами и практическими рекомендациями, которые 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.

#### **Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации**

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

#### **1. 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. В чем состоят ключевые отличия предложенной системы поиска антидиабетических соединений от аналогичных решений?

2. В работе поднята проблема «ложноактивных соединений», выявляемых при производительном скрининге. Какие методы их выявления существуют и чем обоснован выбор использованных методов валидации активных соединений?
3. Почему в качестве основной клеточной модели оценки активности соединений были выбраны макрофаги, стимулированные ЛПС?

## 2. Заключение

Таким образом, диссертационная работа Бабкова Дениса Александровича 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, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Бабков Денис Александрович заслуживает присуждения ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология.

### Официальный оппонент

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ, профессор, доктор медицинских наук

Покровский Михаил Владимирович

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ  
 Адрес: 308007 г. Белгород, ул. Победы, 85  
 Тел: +7 (4722) 30-12-11  
 E-mail: info@bsu.edu.ru  
<https://bsuedu.ru>

Личную подпись удостоверяю Ведущий специалист по кадрам департамента управления персоналом	
	
« 16 » 08 20 23 г.	



**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	Покровский Михаил Владимирович
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	ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ
Занимаемая должность	заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии
Почтовый индекс, адрес	308007 г. Белгород, ул. Победы, 85
Телефон	(4722) 30-18-59
Адрес электронной почты	mpokrovsky@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"> <li>1. Тарасова, А. П. Инкретиновые пептиды: новые мишени в коррекции ишемически-реперфузионных повреждений миокарда / А. П. Тарасова, М. В. Покровский, Л. М. Даниленко // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2020. – № 1. – С. 29-36.</li> <li>2. Патент № 2687979 С1 Российская Федерация, МПК G09В 23/28, А61К 31/40, А61К 31/4164. Способ коррекции стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот : № 2018109513 : заявл. 19.03.2018 : опубл. 17.05.2019 / М. В. Корокин, М. В. Покровский, Т. Г. Покровская [и др.] ; заявитель федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" (НИУ "БелГУ").</li> <li>3. Study of anti-inflammatory activity of a new non-opioid analgesic on the basis of a selective inhibitor of TRPA<sub>1</sub> ion channels / E. A. Beskhmel'nitsyna, M. V. Pokrovskii, A. A. Peresypkina [et al.] // Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 18. – No 2. – P. 110-125.</li> <li>4. Полтев В.Ю., Покровский М.В., Костина Д.А. Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера улучшают профиль безопасности йодсодержащих рентгенконтрастных средств в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. –</li> </ol>

	<p>2022. – Т. 85. – № 2. – С. 36-42.</p> <p>5. Lebedev P., Peresyapkina A., Goliusov A., Pokrovskii M., Gustinovich V., Godunov O., Zatolokina M. Correction of metabolic disturbances by functional food compositions in experimental obesity in CD-1 and Agouti-yellow mice // Functional Foods in Health and Disease. – 2022. – Т. 12. – № 1. – С. 26-45.</p> <p>6. Галенко-Ярошевский П.А., Покровский М.В., Нефедов Д.А., Павлюченко И.И., Степанюк Г.И., Гулевская О.Н., Зеленская А.В., Гудырев О.С., Уваров А.В., Чуян Е.Н., Раваева М.Ю., Манохин А.А. Димефосфон как дерматопротективное средство при редуцированном кровообращении в коже на фоне нормогликемии и сахарного диабета // Монография / Краснодар, 2021.</p> <p>7. Покровский М.В., Гудырев О.С., Замыцкий Я.М., Солдатов В.О., Поветка Е.Е. Способ моделирования остеопороза на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс // Патент на изобретение RU 2712153 С1, 24.01.2020. Заявка № 2019123999 от 30.07.2019.</p>
--	---

Официальный оппонент

М.В. Покровский

Подпись доктора медицинских наук, профессора Покровского Михаила Владимировича подтверждаю.

Личную подпись удостоверяю Ведущий специалист по кадрам управления по развитию персонала и кадровой работе	<i>Покровский</i>
	<i>Шаф. Шафиров</i> <i>27.12</i>

Председателю диссертационного  
Совета 21.2.005.02  
Академику РАН, д.м.н., профессору  
В.И.Петрову  
на базе Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения  
высшего образования «Волгоградский  
государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ  
(400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д.1)

### СОГЛАСИЕ ОППОНЕНТА

Я, Покровский Михаил Владимирович, доктор медицинских наук по специальности 3.3.6. (14.03.06) Фармакология, клиническая фармакология, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ, 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.

О месте и дате защиты проинформирован.

«27» декабря 2022 г.

подпись

Подпись доктора медицинских наук, профессора Михаила Владимировича Покровского заверяю

Адрес: 308007 г. Белгород, ул. Победы, 85  
ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный  
исследовательский университет»  
Телефон: 8-910-314-73-93  
e-mail: [mpokrovsky@yandex.ru](mailto:mpokrovsky@yandex.ru)

Личную подпись  
удостоверяю  
Ведущий специалист  
по кадрам управления  
по развитию  
персонала и  
кадровой работе

