

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Ленской Марины Владимировны «Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук в диссертационный совет Д 208.008.02 при Волгоградском государственном медицинском университете по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Актуальность избранной темы. Сахарный диабет второго типа (СД2) представляет собой серьезную медико-социальную проблему, значимость которой обусловлена его высокой распространенностью, хроническим течением и высоким уровнем инвалидизации и смертности больных. Среди причин смерти СД2 занимает 3-е место после сердечно-сосудистых заболеваний и онкологии. СД2 характеризуется сочетанием прогрессирующего снижения чувствительности к инсулину (инсулинорезистентность) и неадекватной компенсационной секрецией инсулина, что является результатом дисфункции β -клеток и приводит к развитию гипергликемии и других симптомов СД 2.

На сегодняшний день предупреждение и терапия СД 2 затруднены, поскольку используемые в настоящее время для лечения СД2 лекарственные препараты недостаточно эффективны, в том числе в отношении защиты секреторной функции β -клеток, и обладают существенными побочными эффектами. В частности, для производных сульфонилмочевины характерно развитие вторичной резистентности, а применение ингибиторов дипептидил-пептидазы-IV повышает частоту развития панкреатита. Кроме того, многие антидиабетические вещества вызывают развитие гипогликемии и нарушение функций желудочно-кишечного тракта.

Вышеизложенное определяет необходимость продолжения активного поиска новых терапевтических стратегий лечения СД2, в частности, разработки препаратов, воздействующих одновременно на несколько основных звеньев заболевания, и обеспечивающих предотвращение прогрессирования диабета на стадии его развития.

В последние годы, с целью поиска новых гипогликемических средств, внимание исследователей привлекают производные гуанидина, представителем которых является золотой стандарт современной фармакотерапии сахарного диабета – метформин.

Таким образом, диссертационная работа Ленской Марины Владимировны, посвященная поиску новых эффективных гипогликемических соединений в ряду циклических гуанидинов и разработке системы ретроспективного и проспективного прогноза эффективности на основе анализа существующих баз данных по структуре и активности соединений является актуальным исследованием, имеющим значение, как для фундаментальной, так и прикладной фармакологии.

Научная новизна полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Впервые создана система направленного поиска *in silico* нового класса - производных циклических гуанидинов с гипогликемической активностью, основанная на консенсусе прогнозных оценок, полученных несколькими методами (система PASS, ИТ «Микрокосм», подструктурный анализ, частотный анализ физико-химических свойств, ADMET). Впервые выполнен анализ *in silico* механизма антидиабетического действия активного соединения из класса циклических гуанидинов. Впервые проведено изучение *in silico* основных фармакокинетических, фармакодинамических, токсических свойств наиболее активных производных циклических гуанидинов. Впервые изучено влияние диабенола на активность белков мишеней, регулирующих углеводный обмен: PYGL_{Cat}; JAK2 inh; PARP1; PDK4; MGAM_{AGlu}; HK-4; AMPK; PPAR_g agon; HK-4 activ; FBP1; PTP1B и AMPK. Впервые показано (в исследованиях *in silico*, *in vitro* и *in vivo*) отсроченное ингибирование диабенолом (при курсовом введении) фермента дипептидилпептидазы-4.

Впервые изучена эффективность диабенола в лекарственной форме в сравнении с диабенолом в субстанции при курсовом введении. Показано, что диабенол в лекарственной форме, как и диабенол в субстанции, увеличивает секрецию инсулина, снижает гликемию, скорость гликолиза и гликогенолиза, а также повышает гликоген в печени. Кроме того, показано, что под влиянием диабенола наблюдается снижение вязкости и тромбогенного потенциала крови.

Степень достоверности и обоснованности результатов и выводов. Достоверность экспериментальных данных обеспечивается применением верифицированных методов исследований, большим числом использованных лабораторных животных (крысы линии wistar и беспородные крысы (700), беспородные мыши (600) и кролики-самцы «Шиншилла» (10), а также методов исследования *in silico*. Анализ данных и их обобщение проведены с применением современных методов математической статистики и прикладной математики, соответствующих характеру полученных данных и задачам диссертационной работы.

Все выявленные эффекты, закономерности, обобщения и выводы подтверждаются сериями независимых экспериментов, компьютерных расчетов и результатами статистического анализа.

Научно-практическая значимость полученных соискателем результатов. Создан банк данных производных циклических гуанидинов проявляющих гипогликемическую активность. В результате выявленных закономерностей между гипогликемической активностью производных бензимидазола (встроенных циклических гуанидинов) и их химической структурой разработана система поиска с использованием нескольких информационных

технологий компьютерного прогноза для выявления наиболее значимых веществ, проявляющих гипогликемические свойства.

Определены перспективные базовые структуры для поиска и последующего изучения новых лекарственных веществ с антидиабетической активностью. Полученные данные позволяют оптимизировать направленный поиск гипогликемических веществ среди циклических гуанидинов.

Комплексное исследование фармакологических и токсических свойств наиболее эффективных соединений позволяет наметить перспективы по созданию на их основе лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета типа II.

Доказано, что диабенол в лекарственной форме обладает высокой активностью, по эффективности не уступает диабенолу в субстанции и имеет преимущества перед известными антидиабетическими препаратами, что обосновывает целесообразность дальнейшего изучения диабенола и проведения клинических исследований.

Результаты работы внедрены в лекционные курсы кафедры фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, кафедры фармакологии Пермской государственной медицинской академии, кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета.

Общая характеристика работы. Диссертация изложена на 285 страницах машинописного текста, иллюстрирована 59 таблицами (а также 63 таблицами в приложениях), 38 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VIII), обсуждения результатов, заключения, включающего выводы, практические рекомендации, списка литературы и приложений. Список литературы включает 146 отечественных и 199 иностранных источника.

Во введении обоснована актуальность избранной автором темы с учетом современного состояния и степени ее разработанности, четко сформулированы цель и задачи исследования, выделены научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, представлены сведения об апробации результатов исследования и о публикации основных результатов.

В первой главе представлен анализ отечественной и зарубежной литературы, обосновывающий гипогликемический потенциал циклических гуанидинов. Описываются новые подходы к поиску и созданию антидиабетических средств. В данной главе обосновывается, что циклические гуанидины являются новым классом гипогликемических средств.

Заключительный раздел обзора посвящен проблеме разработки лекарственных веществ методами *in silico*.

Вторая глава посвящена виртуальному скринингу гипогликемической активности среди новых производных циклических гуанидинов. Для поиска соединений, обладающих гипогликемической активностью, были использованы методы компьютерной обработки информации.

В этой главе на первом этапе был проведен прогноз в системе PASS, который показал перспективность нескольких классов из всех изученных циклических полных гуанидинов. Далее был проведен прогноз в ИТ «Микрокосм» наличия гипогликемической активности производных циклических гуанидинов, путем анализа перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" по выборке известных противодиабетических препаратов.

После проведенного прогноза в ИТ "Микрокосм" антидиабетической активности и выделения наиболее перспективных для дальнейшего изучения классов, проведен прогноз уровня гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов. Для этого прогноза использовали также информационную технологию «Микрокосм» и выборку по ранее изученным производным этого ряда. После прогнозирования наличия гипогликемической активности исследуемых классов проанализировали результаты прогноза уровня гипогликемической активности для производных циклических полных гуанидинов. По данным прогноза выраженной гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены три перспективных класса соединений: N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазолы[1,2-а]бензимидазола, N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо-[1,2а]бензимидазола. Заключительным этапом исследований в данной главе послужил анализ результатов прогноза высокой гипогликемической активности в ИТ "Микрокосм" исследуемых классов, который показал следующие результаты: основные перспективные классы имеют индекс информативности от 1.0 до 5.0. Кроме этого, в данной главе был проведен подструктурный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов который показал, что наиболее перспективным химическим классом производных циклических гуанидинов является класс N⁹-ДгИмБИ. Выявлено, что наиболее лабильной структурой в отношении заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (максимальный супремальный показатель 0,36).

В данной главе был также проведен консенсусный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов. Использование консенсусного анализа для обобщения всех ранее полученных компьютерных прогнозных оценок позволило выявить два

наиболее перспективных класса циклических полных гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью: N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола. Был также проведен виртуальный скрининг среди производных циклических гуанидинов для дальнейшего углубленного изучения и были выбраны соединения следующих химических классов: 2-имино-бензимидазола; 2-амино-бензимидазола; N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензимидазола; N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а] бензимидазола.

По результатам анализа *in silico* производных циклических гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью, наиболее перспективными были обозначены два класса: N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола.

Третья глава посвящена изучению новых наиболее активных производных циклических гуанидинов на экспериментальных моделях диабета в опытах на животных и показано выраженное гипогликемическое действие производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных. На основании полученных данных на модели стрептозотоцинового диабета было определено, что наиболее выраженный гипогликемический эффект (сравнимый с эффектом метморфина) наблюдался у соединения РУ-254, относящегося к классу производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

В главе 4 изучена зависимость гипогликемической активности соединений от их химической структуры и физико-химических свойств. Был проведен частотный анализ, в ходе которого найден 41 физико-химический признак, влияющий на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Кроме этого, в результате частотного анализа были выявлены физико-химические признаки, статистически достоверно влияющие на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола. Подструктурный анализ выполняли по алгоритму, описанному выше, в главе 2. На основании проведенного подструктурного анализа установлено, что есть статистически достоверный заместитель R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, который обуславливает высокий уровень гипогликемической активности. Для трех наиболее активных соединений с помощью программы FarmFor программного комплекса ИТ «Микрокосм» был проведен сравнительный фармакофорный анализ. Фармакофорные спектры трех соединений-лидеров формировались из присутствующих в структуре этих соединений статистически значимых QL-признаков 4-го ранга, полученных для всех пяти уровней значимости, по обеим обучающим выборкам и всем

градациям активности. В ходе подструктурного анализа влияния заместителей на гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов установлено, что есть статистически достоверный заместитель R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, который обуславливает высокий уровень гипогликемической активности.

На основании фармакофорного анализа выявлено, что наиболее перспективным соединением, с точки зрения наличия в химической структуре фрагментов, ответственных за достаточно высокий уровень гипогликемической активности, является соединение производное циклических гуанидинов класса N¹N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола. В данной главе была проведена оценка специальных характеристик ADME, рассчитанных с помощью модуля QikProp системы Schödinge, которая, в общем, показала соответствие соединений-лидеров всем основным референсным физико-химическим параметрам. Таким образом, на основе проведенных исследований выявлено соединение-лидер (PY-254), которое было использовано для последующих фармакологических исследований.

В главе 5 были исследованы антидиабетогенные свойства соединения PY-254 (диабенол) в субстанции и в лекарственной форме (таблетках) в опытах на кроликах и было показано гипогликемическое действие (достоверное снижение уровня сахара в крови) и субстанции и гранулята таблеток. Далее исследования проводили на крысах с моделированным стрептозотоциновым диабетом, при однократном введении субстанции диабенола. Субстанцию диабенола изучали в трех дозировках: 25, 50 и 100 мг/кг при пероральном введении. При курсовом введении были изучены колебания уровня сахара в крови на протяжении 28 дней введения диабенола в виде субстанции и гранулята таблеток (в дозе 50 мг/кг). Было показано, что субстанция и гранулят таблеток диабенола обладают антидиабетогенными свойствами, влияя на углеводный обмен и увеличивая утилизацию глюкозы.

Глава 6 посвящена изучению механизма антидиабетогенного действия диабенола. Показано, что диабенол в условиях экспериментального сахарного диабета, не оказывает прямого влияния на ключевые ферменты углеводного обмена, но косвенно изменяет метаболические процессы, ингибируя ДПП-4.

Глава 7 посвящена изучению влияния диабенола на свертываемость крови и гемореологические свойства у крыс со стрептозотоциновым диабетом. В результате исследований, проведенных на животных со стрептозотоциновым диабетом, установлено, что диабенол (как в грануляте таблеток, так и в субстанции) ингибирует функциональную активность тромбоцитов и что ему характерна, как выраженная антиагрегантная активность, так и нормализующее действие на параметры вязкости крови.

При обсуждении результатов проведено обоснованное сопоставление полученных результатов с данными, опубликованными в научной литературе. Отдельно вынесено

заключение, обобщающее все выявленные эффекты производных нового класса – циклических гуанидинов.

Выводы и научно-практические рекомендации подтверждены полученными результатами, обоснованы и представлены в соответствии с целью и задачами исследования.

По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, в том числе 13 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 7 глав в 2 монографиях.

Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Однако, при знакомстве с работой возникли следующие вопросы.

1. При использовании экспериментальной стрептозотоциновой модели развитого диабета второго типа, кроме регистрации уровня глюкозы в крови, как правило, регистрируется показатель изменения веса. Почему этот показатель не использовался в Ваших исследованиях?

2 Известно, что бигуаниды обладают гепатотоксичностью, а при их длительном применении может развиваться кардио-васкулярная патология. Изучались ли эти и другие побочные эффекты для новых циклических гуанидинов при их курсовом применении? И, если изучались, то какие были выявлены побочные эффекты?

3 В диссертации отсутствуют данные по токсичности соединений, хотя в тексте и заключениях упоминается, что они обладают разной токсичностью.

4 На основании результатов анализа *in silico* механизма действия диабенола было определено, что он может оказывать влияние на активность ряда белков мишеней. DPP-4, как мишень не вызывает сомнений. На основании чего были выбраны другие белки мишени, некоторые из которых не являются патогенетическими маркерами диабета, например, PARP1, используется как маркер при онкологии?

5 Почему исследования на модели стрептозотоцинового диабета проводили на самках, а не на самцах, как в других исследованиях с использованием этой модели?

Заданные вопросы и замечания не умаляет общего положительного мнения о диссертации.

Заключение. Диссертационная работа Ленской Марины Владимировны «Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи создания новых препаратов с антидиабетической активностью, имеющей существенное значение для фармакологии и клинической фармакологии.

По актуальности темы и решаемых задач,, новизне полученных результатов, объему, методическому и методологическому уровню проведенных исследований, теоретической и научно-практической значимости, полноте их опубликования, диссертационная работа полностью соответствует критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013г.), установленным для докторских диссертаций, а ее автор, Ленская Карина Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология.

Официальный оппонент
Заведующая лабораторией психофармакологии
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский
институт фармакологии имени В.В. Закусова»,
доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ,
Лауреат Государственной Премии СССР



Воронина Татьяна Александровна

Подпись Ворониной Т.А. Заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ
«НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»
канд биол наук



Крайнева Валентина Александровна

« 15_» января 2018 г.

Воронина Татьяна Александровна, доктор медицинских наук, шифр специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующая лабораторией психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова») 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, e-mail: zakusovpharm@mail.ru, Телефон: (499) 151-18-81.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОФИЦИАЛЬНОМ ОППОНЕНТЕ ВОРОНИНОЙ Т.А.

по диссертации Ленской Карины Владимировны «Циклические гуанидины- новый класс гипогликемических средств»,
представленной на соискание ученой степени доктора наук
по специальности 14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология.

ФИО	Год рождения, гражданство	Место основной работы (с указанием организации, ее ведомственной принадлежности, должности, должность города), должность	Ученая степень (с указанием шифра специальности, по которой защищена диссертация)	Ученое звание (по специальности, кафедре)	Шифр специальности и отрасли науки	Основные 3 работы (за последние 3 года)
Воронина Татьяна Александровна	1938 г., РФ	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», ведомственная принадлежность Федеральное агентство научных организаций, г. Москва, заведующая лабораторией психофармакологии	Доктор медицинских наук (14.03.06-фармакология, клиническая фармакология)	Профессор (14.03.06-фармакология, клиническая фармакология)	14.03.06-фармакология, клиническая фармакология, медицинское науки	1. Воронина Т.А. Пионер антиоксидантной нейропротекции. 20 лет в клинической практике // Русский медицинский журнал. Неврология. – 2016. – № 1. – С. 1-6. 2. Воронина Т.А. Роль гипоксии в развитии инсульта и судорожных состояний. Антигипоксанта // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 63-70. 3. Воронина Т.А., Литвинова С.А., Неробкова Л.Н., Авакян Г.Г., Гайдуков И.О., Авакян Г.Н. Сравнительные противосудорожные и противогипоксические эффекты астрокса и мексидола в инъекционных лекарственных формах и 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината в субстанции // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 115-121. 4. Островская Р.У., Озерова И.В., Гудашева Т.А., Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина

						Т.А., Середенин С.Б. Сравнительная активность пролинсодержащего дипептида «Ноопепт» и ингибитора дипептидил-пептидазы-4 Ситаглиптина на модели развивающегося диабета у крыс. // Бюл. Экспер биологии и медицины, 2013, т. 9, с. 317-322. 5 Островская Р.У., Золотов Н.Н., Озерова И.В., Иванова Е.А., Капица И.Г., Тарабан К В., Мичунская А.Б. Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Ноопепт восстанавливает показатели инкретиновой системы при моделировании диабета у крыс. //Бюлл экспериментальной биологии и медицины 2014, т.157, 3, 321-27. 6. Середенин С.Б., Островская Р.У., Воронина Т.А., Золотов Н.Н., Яркова М.А., Дурнев А.Д. Средство для профилактики и лечения диабета.// Патент 2597848 РФ, 2014, Бюл. № 26.
--	--	--	--	--	--	--

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», к.б.н.

10 ноября 2017 г.
125315 г. Москва, ул. Балтийская, 8
тел. (495)601-21-57, (499) 151-18-81
Адрес электронной почты:
zakusovpharm@mail.ru

В.А. Крайнева

