

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Ленской Карины 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. Известно, что сахарный диабет 2 типа представляет собой серьёзную медико-социальную проблему, значимость которой обусловлена его высокой распространенностью, хроническим течением, высоким уровнем инвалидизации и смертности больных.

Согласно компетентному мнению большинства эндокринологов, производное гуанидина метформин (сиофор, глюкофаж) является "золотым стандартом" современной фармакотерапии сахарного диабета 2 типа, ведутся интенсивные научные исследования в направлении поиска и синтеза новых гипогликемических лекарственных средств из группы производных гуанидина.

Несмотря на значительные достижения современной антидиабетической фармакотерапии отмечаются различные формы устойчивости к назначаемым препаратам со сложным генезом развития побочных эффектов. Стадийность и особенности генеза сахарного диабета сказываются на развитии резистентности к проводимой терапии, либо являются причинами значительного количества отрицательных эффектов.

В существующем многообразии лекарственных средств, применяемых в клинике, не существует препарата, влияющего на патогенетически первичные звенья сахарного диабета. Кроме того, длительная фармакотерапия зачастую приводит к развитию толерантности, поэтому целесообразность создания новых высокоэффективных и низкотоксичных сахароснижающих веществ остается весьма актуальной. В настоящее время существует два подхода к поиску новых соединений с гипогликемической активностью: оптимизация структуры известных лекарственных препаратов для снижения токсичности и увеличения эффективности, а также мишень-ориентированный подход.

В работе Ленской К. В. разработана система ретроспективного и проспективного прогноза, позволившая провести анализ существующих баз данных по

структуре и активности соединений для поиска новых эффективных гипогликемических веществ.

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 высокоактивного вещества класса циклических гуанидинов. Впервые проведено изучение *in silico* основных фармакокинетических, фармакодинамических и токсических свойств наиболее активных производных циклических гуанидинов. Впервые изучено влияние диабенола на активность следующих белков мишеней, регулирующих углеводный обмен: PYGL_{Cat}; JAK2 inh; PARP1; PDK4; MGAM_{AGlu}; НК-4; AMPK; PPAR_g agon; НК-4 activ; FBP1; PTP1B и AMPK. Впервые показано (*in silico*, *in vitro* и *in vivo*) отсроченное ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) диабенолом при курсовом введении.

Впервые изучена эффективность лекарственной формы при курсовом введении в сравнении с субстанцией. Показано, что лекарственная форма, как и субстанция, увеличивает секрецию инсулина, снижает гипергликемию, скорость гликолиза и гликогенолиза, а также стабилизирует уровень гликогена в печени. Кроме этого, наблюдалось снижение вязкости крови и её тромбогенного потенциала. Впервые изучен механизм гипогликемического действия твердой лекарственной формы диабенола.

Степень достоверности и обоснованности результатов и выводов. Достоверность экспериментальных данных обеспечивалась применением верифицированных методов исследований, экспериментальных моделей, использованием достаточного количества лабораторных животных (700 крыс линии Wistar и белых беспородных крыс, 600 мышей и 10 кроликов-самцов породы "Шиншилла") и методов исследования *in silico*. Анализ данных и их обобщение проведены с применением методов математической статистики и прикладной математики, соответствующих задачам диссертационной работы и характеру полученных данных.

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

Научно-практическая значимость полученных соискателем результатов. Создан банк данных производных циклических гуанидинов, проявляющих сахароснижающую 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 соединений, проявляющих гипогликемические свойства.

Определены перспективные базовые структуры для поиска и последующего изучения новых лекарственных веществ. Полученные экспериментальные данные позволяют проводить направленный поиск гипогликемических веществ среди циклических гуанидинов. Доказано, что эффективность лекарственной формы не уступает субстанции, что свидетельствует о целесообразности проведения клинических исследований. Комплексное исследование фармакологических и токсических свойств наиболее эффективных соединений позволяет наметить перспективы по созданию на их основе лекарственных препаратов с оригинальным механизмом действия для лечения сахарного диабета типа II. Результаты работы внедрены в лекционные курсы кафедр фармакологии Саратовского государственного медицинского университета и Пермской государственной медицинской академии, кафедры фармакологии и биоинформатики, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета.

Общая характеристика работы. Диссертация изложена на 285 страницах компьютерного 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 прило-

жений. 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 апробация результатов исследования, сведения о публикации основных результатов и возможности их внедрения, то есть данный раздел отвечает всем основным формальным требованиям.

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 подтверждается, что циклические гуанидины являются новым классом гипогликемических средств. Заключительный раздел обзора посвящен разработке лекарственных веществ методами *in silico*.

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

В этой главе на первом этапе был проведен прогноз в системе PASS, который показал перспективность нескольких групп веществ из всех изученных циклических полных гуанидинов. Далее был проведен прогноз наличия сахароснижающей активности у производных циклических гуанидинов с помощью ИТ "Микрокосм" путем анализа перспективности различных групп циклических полных гуанидинов в сравнении с уже известными противодиабетическими препаратами.

После проведенного прогноза антидиабетической активности и выбора наиболее перспективных для дальнейшего изучения групп соединений был проведен прогноз степени гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов. Для этого прогноза также использовали ИТ "Микрокосм" и выборку по ранее изученным производным этого ряда. После прогнозирования

наличия сахароснижающих свойств исследуемых веществ были проанализированы результаты прогноза степени выраженности гипогликемической активности для производных циклических полных гуанидинов. По данным прогноза выраженной гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены несколько перспективных групп соединений: N^1, N^9 -2,3-дигидроимидазолы[1,2-а]бензимидазола, N^9 -2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола. Заключительным этапом явился анализ результатов прогноза высокой гипогликемической активности исследуемых групп веществ с помощью ИТ "Микрокосм", продемонстрировавший наличие высоких индексов информативности (от 1.0 до 5.0). Кроме этого, в данной главе был проведен подструктурный анализ перспективности различных групп циклических полных гуанидинов, показавший, что статистически достоверно наиболее перспективны производные N^9 -2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола. Выявлено, что наиболее лабильной структурой в отношении заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазол (максимальный супремальный показатель 0,36).

В данной главе был также проведен консенсусный анализ перспективности различных групп циклических полных гуанидинов. Использование консенсусного анализа для обобщения всех ранее полученных компьютерных прогнозных оценок позволило выявить две наиболее перспективные группы циклических полных гуанидинов как источников соединений с высокой гипогликемической активностью: N^9 -2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола. В результате проведенного виртуального скрининга среди производных циклических гуанидинов для дальнейшего углубленного изучения и были избраны соединения из следующих групп: 2-иминобензимидазола; 2-аминобензимидазола; N^9 -имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^9 -2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола; N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^1 -2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы; 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а] бензимидазола.

По результатам анализа перспективности производных циклических гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью *in silico*, наиболее перспективными оказались две группы: N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола.

Третья глава посвящена поиску соединений, оказывающих гипогликемическое действие среди новых производных циклических гуанидинов.

В данной главе было показано достаточно выраженное гипогликемическое действие производных N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола в плазме крови интактных животных. На основании полученных данных по направленному поиску новых производных циклических гуанидинов было изучено влияние некоторых наиболее активных веществ изученных химических классов. В экспериментах с использованием модели стрептозотоцинового диабета было определено, что наиболее выраженный (сопоставимый с таковым препарата сравнения метформина) гипогликемический эффект наблюдался у соединения РУ-254, относящегося к классу производных N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола.

В главе 4 изучена зависимость гипогликемической активности соединений от их химической структуры и физико-химических свойств. При проведении частотного анализа был найден 41 физико-химический признак, влияющий на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Выявлены физико-химические признаки, статистически достоверно влияющие на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса N¹,N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола. На основании проведенного подструктурного анализа установлено наличие статистически достоверного заместителя R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, обуславливающего высокий уровень гипогликемической активности. Для трех наиболее активных соединений был проведен сравнительный фармакофорный анализ с помощью программы FarmFor программного комплекса ИТ "Микрокосм". Фармакофорные спектры трех соединений-лидеров формировались из присутствующих в структуре этих соединений статистически значимых QL-признаков 4-го ранга, получен-

ных 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 наличие статистически достоверного заместителя R_3 – диэтиламиноэтил – $(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, обуславливающего 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 из группы производных циклических гуанидинов класса N^1N^9 -2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола. В данной главе была проведена оценка специальных характеристик ADME, рассчитанных с помощью модуля QikProp системы Schödingер, продемонстрировавшая соответствие соединений-лидеров всем основным референтным физико-химическим параметрам. Таким образом, на основе проведенных исследований выявлено соединение-лидер с лабораторным шифром РУ-254, которое было использовано для последующих фармакологических исследований.

В главе 5 были исследованы антидиабетогенные свойства соединения РУ-254, условно названное диабенол. Установлено гипогликемическое действие (достоверное снижение уровня глюкозы в крови) как субстанции, так и гранулята таблеток диабенола в экспериментах на интактных кроликах.

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 (РУ-254) обладает антидиабетогенными свойствами, влияя на углеводный обмен и увеличивая утилизацию глюкозы.

Глава 6 посвящена изучению механизма антидиабетогенного действия диа-

бенола. Установлено, что диабенол обладает инсулиногенным эффектом, а также снижает интенсивность гликогенолиза и гликолиза в печени. Вероятнее всего, что изученное соединение 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 (РУ-254) на агрегатное состояние и реологические свойства крови у крыс со стрептозотоциновым диабетом. Показано, что диабенол (как гранулят таблеток, так и субстанция) ингибирует функциональную активность тромбоцитов, проявляя выраженную антиагрегантную активность и нормализующее действие на параметры вязкости крови.

При обсуждении результатов проведено обоснованное сопоставление полученных данных с литературными. Отдельно вынесено заключение, обобщающее все выявленные эффекты производных нового класса – циклических гуанидинов.

Выводы и научно-практические рекомендации подтверждены полученными результатами, обоснованы и полностью соответствуют цели и задачам 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.

При ознакомлении с диссертацией возникли следующие вопросы:

1. Как можно объяснить механизм повышения активности ДПП-4 примерно в 5 раз у животных со стрептозотоциновым диабетом?
2. Считаете ли Вы, что существует обратная зависимость между уровнем инсулина и активностью ДПП-4?
3. Каким (по совокупности данных вашего исследования, в том числе компьютерного прогноза) представляется механизм антидиабетогенного действия диабенола на молекулярном уровне, в том числе на метаболические пути обмена глюкозы (гликолиз, глюконеогенез, гликогенолиз, гликогенез)?

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет, кроме незначительных редакционных, которые не носят принципиального характера и не

уменьшают общего положительного мнения о диссертации.

Заключение. На основании актуальности выбранной темы, большого фактического материала, научной новизны и практической значимости результатов исследования, возможности внедрения их в практику можно заключить, что диссертационная работа Ленской Марины Владимировны "Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических средств", выполненная при научном консультировании заслуженного деятеля науки РФ, академика РАН, доктора медицинских наук, профессора А.А. Спасова и доктора биологических наук, старшего научного сотрудника П.М. Васильева и представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология, является самостоятельным и законченным квалификационным исследованием, решающим актуальную научную проблему в области фармакологии сахароснижающих лекарственных средств, что вносит существенный вклад в развитие фармакологии. Работа К.В. Ленской полностью отвечает всем требованиям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в редакции от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология, а ее автор, Ленская Марина Владимировна, достойна присуждения искомой степени.

Официальный оппонент –
зав. кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России,
чл.-корр. РАН,
д.м.н., профессор



П.А. Галенко-Ярошевский

Адрес: 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4
Тел. 8(861) 262-34-99.
E-mail: Galenko.Yarichevsky@gmail.com

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ:
Специалист по кадрам
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

« » 20__ г.



СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

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

ФИО	Год рождения, гражданство	Место основной работы (с указанием организации, ее ведомственной принадлежности, должности, 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)
Галенко-Ярошевский Павел Александрович	1942 г., РФ	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Краснодар, заведующий кафедрой фармакологии	Доктор медицинских наук (14.03.06-фармакология, клиническая фармакология)	Член-корреспондент РАН, профессор	14.03.06-фармакология, клиническая фармакология, медицина, медицинские науки	1. Бедросова, К.А. Сравнительная гипогликемическая активность бензофурокаина и глибенкламида на модели глюкозо-толерантного теста / К.А. Бедросова, П.А. Галенко-Ярошевский, В.Л. Попков, А.В. Уваров // Фундаментальные исследования. – 2015. - № 1, часть 4. – С. 695-698. 2. Бедросова, К.А. Антидиабетические свойства бензофурокаина и влияние его на эндотелиальную дисфункцию и

						K⁺-каналопатию аорты в эксперименте/ К.А. Бедросова, П.А. Галенко- Ярошевский, В.Л. Попков, А.И. Соловь- ев, А.В. Уваров // Фундаментальные ис- следования. – 2015. - № 1, часть 4. – С. 689-694. 3. Зеленская, А.В. Реамберин и рек- сод. Фармакотерапевтическая коррекция редуцированного кровообращения в ко- же при сахарном диабете. - Краснодар: Просвещение-Юг, 2013. – 202 с.
--	--	--	--	--	--	--

Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
доктор философских наук, профессор



Handwritten signature in blue ink.

Ковелина Т.А.

