

ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ
ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И
РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА
(ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ)

664003 Иркутск, ул. Тимирязева, 16
Тел: (3952) 20-73-67, факс: (3952) 20-76-36
E-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Исх. № 01-4/629 от 09.11. 2018г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции человека»,
д.м.н., профессор РАН
Л.В. Рычкова

« 09 »

2018г.



ОТЗЫВ

ведущей организации **Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»** о научно-практической ценности диссертационной работы **Сарапульцева Алексея Петровича** на тему: **«Патофизиологические механизмы развития дистресса и обоснование поиска фармакологических препаратов стресс-лимитирующего действия (теоретико-экспериментальное исследование), представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология.**

Диссертационное исследование А.П. Сарапульцева посвящено актуальной проблеме патологической физиологии: выявлению основных патофизиологических механизмов повреждения тканей и проведению теоретико-биоинформационно-экспериментального обоснования нового метода патогенетической терапии инфаркта миокарда на примере биологически-активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов.

Актуальность избранной темы исследования.

Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной смерти в мире: они ежегодно уносят 17,5 миллионов человеческих жизней, и если не принять меры, то это число к 2030 году будет составлять более 23 миллионов человек. Сложившаяся ситуация обуславливает необходимость улучшения лечебно-профилактических мероприятий при этих заболеваниях, включая инфаркт миокарда (ИМ).

В основе патогенетического звена ИМ лежит несоответствие между потребностью сердца в кровоснабжении и доставкой крови к нему. В

результате чего в миокард поступает недостаточное количество питательных элементов и кислорода, происходит выброс катехоламинов: адреналина, норадреналина, дофамина, которые в свою очередь стимулируют сердечную деятельность. Потребность миокарда в кислороде возрастает еще больше, секреция катехоламинов в связи с этим усиливается, формируя тем самым порочный круг данного патологического состояния.

Одной из причин недостаточной эффективности лечения ИМ является то, что несмотря на проводимую терапию направленную на ликвидацию окклюзий коронарных артерий, приток крови к ишемической ткани может оставаться затруднённым из-за сохранения или появления феномена *no-reflow*. Использование для лечения синдрома *no-reflow* классических препаратов, применяемых при лечении ИБС, либо неэффективно, как в случае применения нитратов, либо приводит только к улучшению, но не нормализации проходимости микрососудов, как в случае внутрикоронарного введения антагонистов кальция или аденозина, либо сказывается только на снижении острой фазы смерти и рецидивировании ИМ.

Кроме этого одним из серьезных моментов чем лечение синдрома *no-reflow*, представляется лечение воспалительного процесса при ИМ, который начинается развиваться ещё до начала гибели кардиомиоцитов.

Следует отметить, что в клинической практике практически отсутствуют методы лечения, улучшающие процессы заживления инфарктированного миокарда, поскольку эффективность воздействия применяемых препаратов осуществляется только за счёт уменьшения сердечной преднагрузки и постнагрузки, то есть за счёт биофизического, а не противовоспалительного действия. Попытки экспериментального воздействия на отдельные компоненты и звенья системы врожденного иммунитета и воспалительной реакции либо усугубляли течение ИМ, либо не оказывали необходимого эффекта.

В связи с этим проблема лечения не только не теряет, но и приобретает все большую актуальность, диктуя необходимость поиска новых химических соединений, способных оказывать системное биологическое действие, оказывая саногенетическое действие на развитие ИМ, и служить основой для создания принципиально нового типа лекарственных средств.

Поэтому логично целью данного исследования явилось выявить основные патофизиологические механизмы повреждения тканей и провести теоретико-биоинформационно-экспериментальное обоснование нового

метода патогенетической терапии инфаркта миокарда на примере биологически-активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов.

Поставленные задачи соответствуют цели исследования. На наш взгляд задачи 3-6 можно было - бы усилить с патофизиологической точки зрения следующим образом: «Например, оценить закономерности изменений активности ферментов в плазме крови и в гомогенате миокарда(показателей цитокинемии и т.д.) под влиянием биологически активных соединений.....».

Методология и методы исследования. Для решения поставленной цели и задач были применены современные как расчетные методы компьютерного прогноза в специализированных компьютерных программах, в том числе методы молекулярной механики и квантовой химии, так и биохимические, иммунологические методы исследования.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие.

Достоверность результатов работы, правомочность основных положений, выносимых на защиту, выводов основаны на достаточном числе экспериментального материала, аргументированном анализе полученных результатов с использованием современных методов статистической обработки материалов, их обсуждения с применением литературных данных. Основные положения диссертации широко представлены на различных научных форумах, включая международные. Личный вклад автора – более 93%.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Приоритетными являются данные, что с использованием 3D-молекулярного моделирования методом сходства к препаратам-эталонам, а также докинга, проведен анализ особенностей взаимодействия представителей группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов с наиболее вероятными белками-мишенями.

Впервые установлено наличие иммуномодуляторного эффекта соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов, проявляющееся уменьшением нейтрофильной и увеличением макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации зоны инфаркта и подтверждена способность этих соединений стимулировать, как внешний, так и внутренний апоптоз, активность которого коррелирует с уменьшением зоны повреждения, предотвращением рецидивирования и ускорением репарации при инфаркте миокарда.

Выявлена способность соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов уменьшать выраженность стрессорной реакции при иммобилизационном стрессе.

Проведенные исследования патогенетически обосновали теоретическую основу для выявления и синтеза новых химических соединений, способных снижать активность иммунопатофизиологических механизмов воспаления и стрессорного ответа организма.

Научно-практическая значимость работы заключается в экспериментальном доказательстве возможности медикаментозного обеспечения кардиопротективного эффекта при инфаркте миокарда за счет действия на центральные звенья развивающейся стрессорной реакции.

Несомненно научной новизной обладают данные о терапевтической эффективности соединения L-17 группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов, что является основанием для планирования его дальнейших расширенных доклинических химико-фармацевтических, фармакокинетических и токсикологических исследований.

Важным является то, что в рамках работы разработана новая *in silico* методология системного анализа мультитаргетных механизмов действия лекарственных соединений, которая может быть успешно применена для поиска новых мультитаргетных фармакологически активных веществ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 33 научные работы, из них 13 статей и 5 тезисов в рецензируемых научных изданиях, получено 3 патента на изобретение.

Оценка содержания диссертационной работы.

Диссертация изложена на 299 страницах машинописного текста, состоит из введения, главы обзора литературы, главы материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций, а также списка литературы, включающего в себя 391 источник, из них 79 отечественных и 312 зарубежных и приложения. Работа содержит 36 таблиц, 47 рисунков. Оригинальность текста составила 83,3%; заимствование –13,68%; цитирование – 2,99%, что свидетельствует о высоком личном вкладе в написании данного диссертационного исследования.

Во введении автор аргументированно, со ссылками на источники современной литературы, обосновывает актуальность исследования, научную новизну, практическую и теоретическую значимость, формулирует цель и задачи, положения, выносимые на защиту.

В «Обзоре литературы» (глава 1) автор детально останавливается на современных представлениях проблемы стресса и инфаркта миокарда. Показаны роль стрессорной реакции и ее взаимосвязь с иммунной системой, основные биологические механизмы воздействия стресса на сердечно-сосудистую систему, проанализированы эпидемиологические показатели распространенности инфаркта миокарда.

Важным разделом «Обзора литературы» является раздел, посвященный экспериментальным методам терапии инфаркта миокарда, касающиеся методов лечения, направленных на улучшение процессов заживления инфицированного миокарда. Акцент делается на иммунной системе как терапевтической мишени при инфаркте миокарда. Представлены материалы, касающиеся воздействия различных веществ на гуморальные компоненты врожденного иммунного ответа, на систему цитокинов и интегринов, на систему комплемента, на клеточные компоненты системы врожденного иммунитета, систему приобретенного иммунитета. Интересными являются материалы альтернативных терапевтических подходов к лечению больных с инфарктом миокарда, направленных на триггеры воспалительных реакций. При этом проводится анализ и обсуждение причин малой эффективности лечения воспалительной реакции при ИМ и обосновывается, что вопросы касающиеся воздействия на иммунную систему при ИМ остаются еще недостаточно проработанными и требуют дальнейших исследований.

Итогом этого раздела литературного обзора явилось утверждение, что при ИМ необходимо дополнить стандартную кардиологическую терапию активным использованием препаратов, обладающих одновременно противовоспалительными и антистрессорными свойствами.

Широко раскрыты вопросы об экспериментальных методах терапии инфаркта миокарда и поиска новых лекарственных средств.

В заключении литературного обзора автором высказывается обоснование необходимости создания новых высокорентабельных инновационных типов лекарственных средств, поиска способов оптимизации процесса поиска новых химических соединений.

Глава 2 - Материалы и методы.

Общий дизайн исследования подробно представил исследование, направленное на поиск новых стратегий коррекции восстановительных процессов при экспериментальном инфаркте миокарда, которое включало в себя два логических блока: блок системного анализа *in silico*

мультитаргетного механизма действия 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромида и блок экспериментов *in vivo*.

При общем описании системного анализа *in silico* была поставлена цель исследования: системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия соединения L-17. В проведенном исследовании в качестве материалов выступали данные по 2D- и 3D-структуре изучаемых химических соединений, референсных препаратов и веществ, а также белков-мишеней. При выборе белков-мишеней, релевантных спектру фармакологической активности L-17, использовались обобщенные данные по результатам экспериментального тестирования данного соединения.

Перечень перспективных для L-17 по прогнозу в PASS системных видов активности расширяли с учетом результатов экспериментального изучения фармакологических эффектов данного соединения. Анализ таргетных механизмов действия наиболее перспективных системных видов активности соединения L-17 выполняли с помощью программы PharmaExpert 10.1 [53]. Для каждого перспективного системного вида активности выявляли набор связанных с конкретными белками-мишенями видов активности, определяющих наличие данного системного вида активности. Для найденных мишень-ориентированных видов активности в программе PASS вычисляли значения P_a , P_i и P_a/P_i . Перечень перспективных для L-17 таргетных видов активности определяли, как с учетом результатов прогноза в PASS, так и по данным его экспериментального фармакологического тестирования.

На следующем этапе сначала выполняли поиск валидных экспериментальных или теоретических 3D-моделей белков-мишеней, релевантных спектру фармакологической активности соединения L-17. Первичная информация об этих белках для *Homo sapiens* была получена из базы знаний UniProtKB [377].

Наилучшая экспериментальная рентгеноструктурная 3D-модель из списка UniProtKB выбиралась по трем критериям: 1) как можно большая длина смоделированной аминокислотной последовательности (в идеале – полностью вся последовательность); 2) как можно меньшая длина волны рентгеновского излучения (желательно, менее 2 Å); 3) как можно меньшее число фрагментов смоделированного белка (желательно, одна полностью разрешенная цепочка).

Если в UniProtKB ссылки на экспериментальные 3D-модели анализируемого белка отсутствовали, проводился поиск наилучшей

теоретической модели в базе данных ModBase [266], ссылка на поиск в которой также имеется в описании белка на UniProtKB.

Наилучшая теоретическая 3D-модель из списка ModBase выбиралась по трем критериям: 1) как можно большая длина смоделированной аминокислотной последовательности (в идеале – полностью вся последовательность); 2) как можно больший процент идентичных аминокислот в моделируемом белке, в сравнении с белком-шаблоном; 3) как можно большая статистическая достоверность модели, по совокупности критериев оценки качества теоретической модели.

Следующим важным этапом диссертационного исследования был выбор референсных веществ для релевантных биомишеней, построение и оптимизация их 3D-моделей. Для референсных веществ и препаратов сравнения выполнен анализ механизмов связывания только с сайтами двух целевых биомишеней. Проведен сравнительный анализ молекулярных механизмов действия на целевые биомишени соединения L-17 в сопоставлении с миратзапином, сульпиридом и двумя референсными веществами. Выработаны рекомендации по возможной модификации соединения L-17 с целью увеличения его активности в отношении двух целевых биомишеней.

Дизайн экспериментального исследования *in vivo*.

В эксперименте *in vivo* было задействовано 150 белых беспородных крыс самцов массой 200-250 г. Данный раздел написан обстоятельно, четко прописаны условия содержания животных, этапы проведения эксперимента с описанием премедикации, наркоза. Четко обоснованы использованные модели инфаркта миокарда, метод моделирования ИМ, сроки выведения животных из эксперимента.

Применены корректные, современные лабораторные методы исследования. Четко прописаны и проведены исследования биохимических маркеров некроза миокарда.

Статистические методы, применяемые для обработки экспериментального материала адекватные, корректные.

Глава 3.

Основной целью данной части работы являлся системный анализ *in silico* мультитаргетного механизма действия 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромида (соединения L-17).

Для достижения поставленной цели, в соответствии с дизайном исследования, были последовательно выполнены 12 основных этапов:

- Определение *in silico* для соединения-лидера (соединения L-17) наиболее перспективных таргетных видов активности;
- Поиск валидных 3D-моделей релевантных белков-мишеней и выявление их специфических сайтов связывания;
- Выбор референсных веществ для релевантных биомишеней, построение и оптимизация их 3D-моделей;
- Проведение докинга соединения L-17, препаратов сравнения и референсных веществ в специфические сайты релевантных белков-мишеней;
- Сравнительный анализ таргетного *in silico* спектра фармакологической активности соединения L-17;
- Сравнительный многомерный дисперсионный анализ спектров энергии докинга соединения L-17;
- Формирование фокусированной библиотеки производных 1,3,4-тиадиазина, структурно сходных с соединением L-17;
- Построение и оптимизация 3D-моделей производных 1,3,4-тиадиазина фокусированной библиотеки;
- Выполнение докинга производных 1,3,4-тиадиазина фокусированной библиотеки в специфические сайты релевантных белков-мишеней;
- Построение нейросетевых системных моделей мультитаргетного механизма действия соединения L-17 и оценка их статистической значимости;
- Анализ нейросетевых системных моделей мультитаргетного механизма действия соединения L-17;
- Сравнительный анализ молекулярных механизмов связывания соединения L-17 и референсных веществ со специфическими сайтами наиболее важных биомишеней.

Глава заканчивается списком опубликованных работ, что позволяет оценить широту и качество рецензирования данного раздела.

Глава 4 посвящена оценке кардиопротективного действия соединения L-17 на модели экспериментального инфаркта миокарда. Этот блок исследования состоял из следующих разделов:

– Гистологические изменения при развитии экспериментального инфаркта миокарда. Данный раздел подтвердил типичную гистоморфологическую картину инфаркта миокарда, включая соответствия срокам формирования и появлению отдельных гистоморфологических признаков.

– Гистологические изменения на фоне введения соединения L-17. Показано, что введение животным соединения L-17 приводит к более раннему и более

активному репаративному процессу в зоне поражения, которое обусловлено способностью данного соединения снижать нейтрофильную инфильтрацию и повышать лимфо-моноцитарную инфильтрацию повреждённого миокарда уже на ранних этапах развития ИМ. Обсуждается патофизиологический процесс, происходящий в субэндокардиальной зоне при ИМ, который называется феноменом невозобновления кровотока (no-reflow), основой которого является неадекватная перфузия миокарда без ангиографических проявлений механической закупорки сосудов, несмотря на агрессивное лечение тромболитиками или чрескожными методами реваскуляризации, и является неблагоприятным прогностическим фактором. Проведённое исследование показало, что соединения L-17 обладает саногенетической направленностью при ИМ, способствуя предотвращению развития феномена no-reflow при ИМ.

Следующим этапом диссертационного исследования была оценка активности трансаминаз у ложнооперированных животных, с экспериментальным инфарктом миокарда и на фоне введения соединения L-17. Следует отметить, что после каждого каждого подраздела полученных данных идет их обсуждение.

Наиболее важным результатом этого этапа работы по данным динамического определения маркерных ферментов в крови и в гомогенате миокарда при экспериментальном ИМ было доказано, что введение экспериментальным животным соединения L-17 уменьшает величину повреждения миокарда и предотвращает рецидивирование ИМ.

В дальнейшем были оценены показатели цитокинемии при экспериментальном инфаркте миокарда на фоне введения соединения L-17. Было сделано заключение, что выявленная в проведённом исследовании способность соединения L-17 уменьшать уровень как провоспалительных, так и противовоспалительных интерлейкинов при ИМ могла играть ведущую роль в уменьшении величины формирования и развитии осложнений ИМ.

При оценки изменения активности процессов апоптоза при экспериментальном инфаркте миокарда под влиянием соединения L-17 было установлено, что активация как внешнего, так и внутреннего пути апоптоза у животных с экспериментальным ИМ на фоне введения соединения L-17 соотносится с более ранним и более выраженным поступлением макрофагов в зону инфаркта, что играет важную роль в уменьшении зоны повреждения и ускорении репарации при экспериментальном ИМ.

По результатам 4-й главы опубликовано 22 работы, включая 12 из списка Web of Science, Scopus, РИНЦ, 3 патента на изобретения.

Одним из серьезных разделов с точки зрения патологической физиологии является **глава 5**, посвященная стресс-протективному действию соединения L-17 на модели иммобилизационного стресса *in vivo*.

Проведенные исследования по оценке влияния соединения L-17 на изменение показателей периферической крови, морфологические и гистологические показатели островкового аппарата поджелудочной железы, надпочечников, тимуса экспериментальных животных при иммобилизационном стрессе позволили утверждать, что антистрессорный эффект соединения L-17 также может объяснить и снижение выраженности воспалительной реакции при экспериментальном ИМ. Механизмы влияния острого и хронического стрессов на выраженность воспалительной реакции обусловлены тем, что острый стресс, в том числе и иммобилизационный, вызывает секрецию кортикотропин-рилизинг-гормона и индуцирует экспрессию мРНК IL-1 в гипоталамусе, что в дальнейшем ведет к активации тучных клеток. Тучные клетки, в свою очередь, являются основным источником не только гистамина, но и цитокинов, таких как TNF- α , который может выходить в межклеточное пространство при дегрануляции последних и становиться посредником в инициации провоспалительного каскада. При этом, именно в сердце имеется большое количество тучных клеток, которые подвергаются дегрануляции при стрессе, вследствие чего снижение выраженности стрессорной реакции на фоне введения соединения L-17 у животных с экспериментальным ИМ может снижать выраженность воспалительной реакции в миокарде.

Список опубликованных работ по этому разделу диссертации составил 9 работ, из них 4 в Web of Science (2,956 – 6,189), 1 в РИНЦ.

Резюмируют содержание работы Заключение и Выводы. В заключении представлен анализ и обсуждение результатов диссертационных исследований, которые логично были завершены концептуальной схемой: «Иммунопатофизиологические механизмы стресс-лимитирующего действия производных 1,3,4-тиадиазинов при инфаркте миокарда на примере соединения L-17», которая наглядно продемонстрировала саногенетические механизмы этих соединений на примере инфаркта миокарда. Выводы, в количестве 7, сформулированы достаточно корректно и обоснованы полученными данными.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ. Анализ автореферата показывает, что он соответствует содержанию диссертации.

В целом работа заслуживает положительной оценки. По содержанию диссертации нет принципиальных замечаний. Имеются лишь частные замечания и вопросы к диссертанту: 1. В работе встречаются орфографические и стилистические ошибки. 2. Список сокращений представлен не полностью, что затрудняет прочтение работы. 3. Вопрос: 1. Можно ли производные 1,3,4-тиадиазинов применять при других патологических состояниях, которые являются для организма одним из вариантов дистресса?

Заключение.

Диссертационная работа Сарапульцева Алексея Петровича на тему: «Патофизиологические механизмы развития дистресса и обоснование поиска фармакологических препаратов стресс-лимитирующего действия (теоретико-экспериментальное исследование), представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований представлено решение актуальной проблемы патологической физиологии: выявление основных патофизиологических механизмов повреждения тканей и проведение теоретико-биоинформационно-экспериментального обоснования нового метода патогенетической терапии инфаркта миокарда на примере биологически-активных соединений группы замещённых 1,3,4-тиадиазинов.

По актуальности, новизне, методическому уровню, теоретической и практической значимости представленная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобразования и науки РФ (утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г., № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология (область применения: п.1,2,3,5,9,10), а ее автор Сарапульцев Алексей Петрович

заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности: 14.03.03 – патологическая физиология.

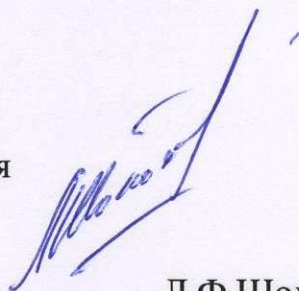
Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторной конференции лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы, лаборатории патофизиологии, лаборатории клинической генетики (30.10.2018г., протокол №4) ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека».

Руководитель лаборатории физиологии
и патологии эндокринной системы
ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья
семьи и репродукции человека»,

д.м.н., профессор

664003, г. Иркутск, ул.Тимирязева, 16, каб. 210, тел. (3952) 20-76-36

E-mail: Lfshol@mail.ru



Л.Ф.Шолохов

Подпись *Шолохова Л.Ф.*
удостоверяю
Начальник отдела
кадров *Можарова Д.Н.*



09.11.2018 г.

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья
семьи и репродукции человека»,

664003, г. Иркутск, ул.Тимирязева, 16, тел./факс 8-(3952)20-76-36

E-mail: iphr@sbamsr.irk.ru