



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук профессора ШАБАНОВА Петра Дмитриевича
на диссертацию УСКОВА Георгия Михайловича «Антикоагулянтные
свойства новых конденсированных производных триазола»,
представленную к публичной защите
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность проблемы

Поиск и изучение новых антикоагулянтных средств остается одной из ведущих биомедицинских проблем во всем мире. Это связано: 1) с широкой распространенностью тромбозмболических заболеваний, в том числе у людей относительно молодого возраста, способных к активной трудовой деятельности, 2) доминированием в терапии производных кумарина (варфарин, неодикумарин, синкумар), требующих подбора и контроля доз на основании МНО (международное нормализованное отношение) = 2-3, 3) с появлением, но еще недостаточно широким распространением новых пероральных антикоагулянтов, проявляющих прямой антагонизм по отношению к фактору свертывания Ха (ривароксабан, апиксабан и другие). В Волгоградском государственном медицинском университете систематически изучаются фармакологические соединения с гетероциклической структурой, в том числе производные триазола (имеющие 3 атома азота в кольце), которые, как выяснилось, проявили себя как эффективные корректоры коагулопатий. Учитывая это, автор выбрал для исследований ряд новых соединений, проявляющих антикоагулянтную активность среди триазоло[1,5-а]пиримидинов и триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, потенциально активных в отношении свертывающей

системы крови. Диссертационное исследование Г.М. УСКОВА фундаментально по сути и направлено на практическое внедрение полученных результатов. Автор поднимает целый новый пласт идей, уточняет методы их реализации, проводит анализ фармакологических возможностей, наконец, формулирует оригинальный подход к лечению тромбэмболических нарушений, фактически обосновывая новую технологию лечения, разработанную и продуктивно примененную автором на доклиническом уровне исследований.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских программ, разрабатываемых в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ, где традиционно уделяют много внимания изучению фундаментальных и прикладных аспектов биомедицинской науки, что лишний раз подтверждает востребованность научного изучения данной проблемы.

Оценка наиболее значимых результатов, полученных автором

Целью исследования диссертанта был поиск антикоагулянтных соединений среди новых производных триазоло[1,5-а]пиримидинов и триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, изучение их механизма действия и антикоагулянтной активности без и в условиях гиперцитокинемии. На основании цели сформулированы конкретные задачи исследования (их 7), касающиеся главным образом выявления и анализа зависимости антикоагулянтной активности от структуры химических соединений в ряду новых конденсированных производных триазоло[1,5-а]пиримидинов и триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов *in vitro* и *ex vivo*, изучения антитромботического действия наиболее активного кандидатного соединения в разных моделях венозных тромбозов с проведением морфологических исследований, выяснением механизма его антикоагулянтного действия, определения цитотоксичности и величины острой токсичности кандидатного соединения с расчетом его условного терапевтического индекса, а также изучение антикоагулянтного действия

соединения-лидера *in vitro* и *in vivo* в условиях гиперцитокинемии, вызванной липополисахаридом.

Для решения этих вопросов автор использовал большой набор современных химико-синтетических, фармакологических, биохимических и клинико-лабораторных методов исследования. Постановка цели и задач работы понятны, конкретны и логичны. Примененные методы исследования, а также характер и количество полученного материала адекватны цели и задачам диссертации. Значительный объем данных, их статистическая обработка, компоновка и дизайн работы, представление и высокий уровень анализа позволяют считать результаты диссертационной работы достоверными, а положения и выводы вполне обоснованными. Заключение и выводы показывают, что основные цель и задачи исследования, поставленные в работе, достигнуты.

Методология исследований была традиционной и включала классические методы оценки фармакологической активности новых соединений *in vivo* и *in vitro*, а также оценку молекулярного механизма действия перспективных кандидатных молекул на животных (мыши, крысы, кролики). Все исследования проведены на сертифицированном оборудовании.

В процессе исследований диссертантом был выявлен ряд важных закономерностей и находок. Так, в работе убедительно обоснован выбор производных [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидина в качестве веществ с прямой антикоагулянтной активностью в сравнении с производными [1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина. При этом найдено, что соединение НС-NAR-0273b (5,7-диметил-4,5-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидин) оказывает выраженную антитромбиновую активность *in vitro* и *ex vivo*. Доказано, что это соединение оказывает антитромботическое действие в разных экспериментальных моделях венозных тромбозов: тромбозе нижней полой вены крыс, вызванном ее перевязкой, тромбозе бедренной вены крыс, индуцированного 50%-ным хлоридом железа, тромбин-индуцированном тромбозе на мышах с проведением морфологических

исследований, а также на модели тромбоза по Горогу. Наконец, автор демонстрирует, что механизм антикоагулянтного действия наиболее активного кандидатного соединения HC-NAR-0273b связано с ингибированием тромбина (IIa фактора свертывания).

Результаты исследований репрезентативны, объемны, корректно обработаны и представлены и, безусловно, не вызывают сомнений.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Представленный большой объем экспериментальных данных (исследования выполнены на 22 кроликах Шиншилла, 295 крысах и 140 мышях, проанализировано 42 новых химически идентифицированных соединения), соответствие дизайна исследования критериям доказательной медицины, комплексное обследование соединений с использованием современных методов, включая корректную статистическую обработку полученных данных, четкое представление материалов диссертации в виде рисунков, таблиц и обстоятельного описания, а также достаточный анализ позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации как вполне обоснованные.

Научная новизна

Диссертант описывает в работе оригинальные данные о выявлении фармакологически активных антикоагулянтов из групп конденсированных производных триазоло[1,5-а]пиримидинов и триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов по показателям коагулограммы *in vitro* и *ex vivo*. При этом методом подструктурного анализа изучена зависимость между химическим строением исследованных соединений и их способностью ингибировать факторы коагуляционного гемостаза. Результатом стало доказательство предпочтительности скаффолда [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидина при поиске веществ с прямой антикоагулянтной активностью в сравнении со скаффолдом [1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина.

Найдено и изучено новое соединение под шифром HC-NAR-0273b, проявляющее антикоагулянтные свойства *in vitro* и *ex vivo*. Определена его антитромботическая активность в разных моделях венозных тромбозов, а также изучен механизм антикоагулянтного действия данного вещества, который обусловлен ингибированием тромбина. Кроме того, исследован антикоагулянтный эффект соединения HC-NAR-0273b в разных моделях тромбозов в условиях гиперцитокинемии, вызванной липополисахаридом *in vitro* и *in vivo*. Сделан вывод, что найденные и изученные соединения могут быть использованы в практической деятельности.

Рецензируемая работа может быть квалифицирована как доказательное обстоятельное исследование в области фундаментальной и клинической фармакологии, гематологии, внутренней медицины и медицинской науки в целом.

Теоретическая и научно-практическая значимость

Теоретическое значение рецензируемой работы состоит в обосновании возможности поиска эффективных антикоагулянтов среди конденсированных производных триазоло[1,5-а]пиримидинов и [1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов. Автором получены убедительные экспериментальные данные об антитромботической активности наиболее активного соединения HC-NAR-0273b в моделях экспериментальных тромбозов (тромбоз бедренной вены крыс, индуцированный поверхностной аппликацией 50%-ного раствора хлорида железа; тромбоз нижней полой вены; тромбин-индуцированный тромбоз легочных артерий с проведением морфологических исследований; тромбоз по методу Горога). Установлен механизм антикоагулянтного действия данного соединения, связанный с ингибированием IIa фактора свертывания (тромбин). В условиях системной воспалительной реакции выявлено усиление антикоагулянтной активности данного соединения, что указывает на возможность его влияния на процессы иммунокоагуляции, связанные с вирусными и бактериальными инфекциями.

Полученные данные получили всестороннюю апробацию, вошли в государственный бюджетный грант (Соглашение в форме субсидий от Правительства РФ) от 01.10.2020 г. № 075-15-2020-777.

Представленные в диссертации данные следует рассматривать как новые, имеющие важное теоретическое и практическое значение для базисной и клинической фармакологии, коагулологии и гематологии.

Результаты исследований Г.М. УСКОВА могут быть полезны для научно-исследовательских работ, проводимых в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербургской государственном медицинском педиатрическом университете МЗ РФ, НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (Москва), Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ (Санкт-Петербург), учреждениях Российской академии наук, Министерства здравоохранения и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и оформление работы

Работа изложена на 189 страницах машинописи, иллюстрирована 31 рисунком и 29 таблицами. Построение диссертации традиционное и соответствует ГОСТу РФ и требованиям ВАК. Диссертация включает введение (С.7-13), обзор литературы (С.14-29), главу материалов и методов исследования (С.30-72), 5 глав (главы 3-7) результатов исследований (С.73-144), обсуждение полученных результатов (глава 8, С.145-152), выводы (С.153-154), перечень сокращений (С.155), список использованной литературы (С.157-178), приложение, содержащее подробное описание химических структур исследованных соединений (С.179-189). Литературный указатель содержит 204 ссылки (27 отечественных и 177 иностранных) на работы, опубликованные в основном за последние 10 лет. Диссертация написана хорошим литературным языком и легко читается.

Статистика

Полученные данные корректно обработаны с применением современных методов статистики. Используемые статистические методы позволяют адекватно оценивать полученные результаты.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 4 статьи, включенные в журналы, рекомендованные ВАК, и 5 работ в сборниках научно-практических конференций. Публикации в целом отражают основные результаты, полученные в диссертационной работе.

Автореферат

Основные положения автореферата диссертации полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы, за исключением практических рекомендаций, которые приведены только в автореферате.

Выводы и практические рекомендации

Диссертация содержит 12 выводов и 2 пункта практических рекомендаций. Все выводы и рекомендации обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертации. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений соискателя следует признать высокой, что обеспечивается как количественной стороной изученного материала, так и качеством его обработки.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. Вместе с тем, в ходе рецензирования диссертационной работы возникли некоторые замечания и следующие вопросы, требующие дополнительного пояснения и уточнения:

1. В выводе 7 диссертации и на стр.22 автореферата автор сравнивает антитромботическую активность соединения HC-NAR-0273b по показателю ED50 с ингибитором тромбина дабигатраном и делает вывод,

что механизм действия исследуемого соединения связан с ингибированием IIa фактора по аналогии с дабигатраном. Вопрос: не совсем понятно, влияет ли исследуемое соединение на фактор Ха, вызывающее каскадный запуск образования тромбина (приблизительно 1000 молекул тромбина), как действуют прямые ингибиторы фактора Ха (ривароксабан, апиксабан), что представляется более выгодным механизмом в сравнении с угнетением фактора IIa? Просьба пояснить более подробно.

2. Не совсем понятны выводы по главе 6, что соединение HC-NAR-0273b проявляет противовоспалительную активность в модели тромбозболии легких у мышей, вызванной внутривенным введением липополисахарида. По описанию автора, внутривенное введение ЛПС вызывает у мышей 100%-ную гибель, а введение соединения HC-NAR-0273b и дабигатрана на 80% в первом случае и 60% во втором случае защищает от смерти лабораторных животных (рис. 8, С.18 автореферата). Вывод 10 диссертации гласит: «...соединение HC-NAR-0273b при однократном внутрижелудочном введении, увеличивало выживаемость мышей, превосходя препарат сравнения дабигатрана этексилат в 1,3 раза». На рис. 8 не приведены результаты сравнительного статистического анализа между указанными группами животных (80% и 60%, соответственно, они сравниваются только с контрольной группой). Просьба пояснить результаты.

3. Как автор видит потенциальное место соединения HC-NAR-0273b в терапии тромботических расстройств в случае его внедрения в практику здравоохранения: как элемент базисной терапии, вспомогательной терапии, лечения отдельных проявлений? С какими препаратами (имеется ввиду существующую антитромботическую терапию) его потенциально можно сочетать, почему? Просьба пояснить более подробно.

В целом, работа производит весьма благоприятное впечатление, как по сути, так и по оформлению.

Все приведенные вопросы и замечания не затрагивают существа работы и сформулированы в плане дискуссии.

Заключение

Диссертация УСКОВА Георгия Михайловича на тему «Антикоагулянтные свойства новых конденсированных производных триазола», выполненная под научным руководством доктора медицинских наук профессора А.Ф. Кучерявенко и представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, является завершённой, самостоятельно выполненной научной квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи в области экспериментальной и клинической фармакологии, состоящей в обнаружении и изучении новых антитромботических средств на основе конденсированных производных триазола, что имеет большое значение для фармакологии, клинической фармакологии, гематологии и медицинской науки в целом. Работа полностью соответствует паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (п.4 «Исследование взаимодействий между организмом и лекарственными средствами, изучение их фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма»). Научная новизна и практическая значимость результатов исследования позволяют утверждать, что данное исследование соответствует п.9 Положения ВАК Министерства образования РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (редакция от 21.04.2016 г. №335 и от 20.03.2021 г. №426) о порядке присуждения ученых степеней на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, УСКОВ Георгий Михайлович, по своей эрудиции, компетенциям, авторитету, научному и практическому опыту достоин присуждения искомой степени.

Официальный оппонент:

Заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки РФ
доктор медицинских наук профессор

Петр Дмитриевич ШАБАНОВ

тел. 8-921-900-1951, e-mail: pdshabanov@mail.ru
Санкт-Петербург, 197376, ул. Акад. Павлова, 12

«18» октября 2022 года



В диссертационный совет 21.2.005.02
на базе Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Волгоградский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ

Сведения об официальном оппоненте

по диссертации Ускова Георгия Михайловича на тему «Антикоагулянтные свойства новых конденсированных производных триазола», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Фамилия, имя, отчество	Шабанов Петр Дмитриевич
Год рождения	1955
Ученая степень (с указанием шифра специальности / специальностей и отрасли науки, по которым защищена диссертация)	Доктор медицинских наук, 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки; 14.03.06)
Ученое звание: (по какой кафедре / по какой специальности)	Профессор по специальности «Фармакология, клиническая фармакология»
Почтовый адрес	197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Телефон	+7 (921) 900-1951
Адрес электронной почты	pdshabanov@mail.ru
Место основной работы (полное наименование организации в соответствии с Уставом)	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
Наименование подразделения	Отдел нейрофармакологии им. С.В. Аничкова
Должность	заведующий
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	
1.	Воробьева В.В., Левченкова О.С., Шабанов П.Д. Активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови кролика зависит от характеристик вибрационного воздействия // Биофизика. 2022. Т.67, №2. С.267-273.
2.	Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Влияние этанола на биологию тромбоцитов // Биомед. химия. 2022. Т.68, №2. С.81-92.
3.	Марышева В.В., Михеев В.В., Шабанов П.Д. Оценка активности этилтиобензимидазола и фабомотизола в модели гиперкапнической гипоксии

	с отключением работы полушарий мозга // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. 2022. Т.20, №1. С.75-82.
4.	Шабанов П.Д., Орлов Ф.А., Тутаева В.В., Орлова Е.Ф., Удальева В.Ю. Лекарственные средства, применяемые в гематологии: классификация и описание препаратов // Рациональная фармакотерапия в гематологии / Под ред. О.А. Рукавицына. М.: Литтерра, 2021. С.549-782. ISBN 978-5-4235-0353-6.
5.	Shabanov P.D., Blazhenko A.A., Devyashin A.S., Khokhlov P.P., Lebedev A.A. In search of new brain biomarkers of stress // Research Results in Pharmacology. 2021; V.7, N1. P. 41–46.
6.	Воробьева В.В., Левченкова О.С., Шабанов П.Д. Анализ чувствительности энергетического обмена тканей сердца, печени, почки и лимфоцитов крови крыс к воздействию локальной вибрации и фармакологической защите сукцинатсодержащим антигипоксантом // Медицина труда и пром. экология. 2021. Т.61, №2. С. 84-89.
7.	Ващенко В.И., Ромашова Ю.Е., Шабанов П.Д. Патофизиология микроРНК-146а при раке легких. Перспективы повышения эффективности таргетной терапии // Обз. по клин. фармакол. и лек. терапии. 2021. Т. 19, № 4. С. 356–380.
8.	Рейхардт Б.А., Шабанов П.Д. Каталитическая субъединица РКА как прототип семейства эукариотических протеинкиназ // Биохимия. 2020. Т.85, №4. С.476-493.
9.	Айрапетов М.И., Ереско С.О., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Роль Toll-подобных рецепторов в нейроиммунологии алкоголизма // Биомед. химия. 2020. Т.66, №3. С.208-215.
10.	Lizunov A.V., Okunevich I.V., Orlov S.V., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Piotrovskiy L.B., Shabanov P.D. The effect of cramizol on <i>ApoA1</i> gene expression in rats with experimental hyperlipidemia // Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomed. Chemistry. 2020. Т. 14. № 1. С. 82-85.

Заместитель директора по научной работе
 ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» МОН РФ
 Член-корреспондент РАН, доктор биологических наук



Shamova

Шамова О.В.

«23» августа 2022 г.

В диссертационный совет 21.2.005.02
на базе Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Волгоградский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ
(400131, г. Волгоград, пл. Павших Героев, д.1)

СОГЛАСИЕ ОППОНЕНТА

Я, Шабанов Петр Дмитриевич, доктор медицинских наук по специальности 3.3.6. (14.03.06) Фармакология, клиническая фармакология, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, даю свое согласие выступить в качестве официального оппонента по диссертации Ускова Георгия Михайловича на тему «Антикоагулянтные свойства новых конденсированных производных триазола», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).

Членом экспертного совета ВАК не являюсь.

О месте и дате защиты информирован.

"23" августа 2022 г.

Адрес: 197022, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12,
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» МОН РФ
Телефон: 8-921-900-1951,
e-mail: pdshabanov@mail.ru

Подпись Шабанова Петра Дмитриевича заверяю
Начальник отдела кадров ФГБНУ «ИЭМ»



О.В. Хабарова