

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Носач Світлани Григорівни

“Цілеспрямований пошук нейропротективних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантинів”, яку подано до спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю

14.03.05 - Фармакологія

1. Актуальність обраної теми дисертаційної роботи.

Активні форми кисню (АФК), як одні з провідних факторів ушкоджуючої дії на клітини, вже тривалий час виступають мішенню фармакологічної дії багатьох лікарських засобів для корекції та зменшення інтенсивності багатьох патологічних процесів. Вони природньо утворюються при окисленні деяких субстратів молекулярним киснем та організм має розвинуту систему їх нейтралізації. Мітохондріальний, мікросомальний, моноаміноксидазний, ксантиноксидазний, фагоцитарний електронотранспортні ланцюги та взаємодія іонів металів змінної валентності з киснем є джерелами утворення активних форм кисню, тобто, вони формуються у всіх тканинах організму. Однак, у тканинах з інтенсивним метаболізмом їх генерація є найбільшою, а, відтоді, й такі тканини у патологічному стані, коли ефективність систем знешкодження АФК є недостатньою, більшою мірою піддаються деструкції. До більш уразливих та життєво важливих відноситься нервова тканина, продукція АФК (супероксидрадикал, гідроксил-радикал, пероксинітрит-аніон, гіпохлорид-аніон тощо) у якій відбувається при багатьох нейродеструктивних станах, викликаючи порушення на молекулярному та клітинному рівні з таким негативними наслідками, як порушення функціональної активності рецепторів, ензимів, індукція апоптозу та вресітї рещт, некротичні процеси мозкової тканини.

Приймаючи до уваги провідну роль активних форм кисню у формуванні та розвитку патологічних процесів, що супроводжують ішемічні стани мозку, обґрунтованим є пошук підходів та сполук - антиоксидантів та

нейропротекторів в терапії подібних патологій. Висока антиоксидантна, кардіопротективна, антиангінальна та протиішемічна активність серед похідних ксантину роблять їх досить перспективним класом сполук, серед яких може бути здійснений такий пошук, тому дисертаційна робота **Носач Світлани Григорівни**, мета якої полягає у виявленні в ряду похідних 3-алкіл(арил, аралкіл)ксантину на підставі даних скринінгові дослідів *in vitro* та *in vivo* найбільш активних сполук з антиоксидантною активністю та нейропротективними властивостями, є актуальною, теоретично обґрунтованою та практично необхідною.

2. Зв'язок теми дисертаційної роботи з державними та галузевими науковими програмами.

Виконання дисертаційної роботи було здійснено в межах науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP₇₀/HIF-1 α -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020) відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету.

3. Особистий внесок здобувача.

Патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури за темою дисертаційної роботи дисертантом проведено самостійно. Виконання роботи було здійснено на базі Навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ атестованому МОЗ України № 033/18 (керівник - д.мед.н., професор Абрамов А.В.) та на кафедрі фармакології та медичної рецептури (завідувач - д.б.н., професор Беленічев І. Ф.) Разом з науковим керівником визначено мету і завдання дослідження, самостійно дисертантом виконана експериментальна

частина дисертації, освоєні і відтворені моделі гострого порушення мозкового кровообігу та внутрішньомозкового крововиливу. Скринінг серед 52 сполук з антиоксидантною активністю серед похідних ксантинів в умовах *in vitro* було проведено автором самостійно. Також дисертантом самостійно здійснені імуноферментні, біохімічні, морфометричні методи дослідження та проведено порівняльний аналіз результатів, а також статистична обробка експериментальних даних.

4. Ступінь обґрунтованості наукових положень дисертації, їх достовірність та новизна.

Формуванню наукових положень дисертаційної роботи Носач С.Г. передувало послідовне, логічне та чітке викладання результатів експериментальних досліджень, побудова та виконання яких підпорядковувались чітко сформульованій меті та розгорнутим завданням дослідження. Дисертантом проаналізовано майже 300 джерел літератури як вітчизняних, так й іноземних авторів, завдяки чому був максимально детально висвітлений стан проблеми нейродеструктивних порушень головного мозку та ролі в цих процесах активних форм кисню, а увага до похідних ксантину, як перспективних сполук з антиоксидантними властивостями, дозволила запропонувати низку потенційно активних сполук. Відповідно до предмету дослідження - антиоксидантної та нейропротективної активності похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів на першому етапі роботи у скринінгу *in vitro* (по інгібуванню утворення NO, інгібуванню окислювальної модифікації білка та за інгібуванням Fe²⁺-залежного вільнорадикального окислення) було визначено високу активність однієї зі сполук - гідразиду 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3), для якої на декількох різних моделях гострого порушення мозкового кровообігу (двостороння перев'язка загальних сонних артерій та внутрішньомозкове введення аутокрові) встановлена нейропротективна активність. Автором отримано комплексні результати не

тільки антиоксидантного впливу, оціненого за показниками інгібування окислення аскорбінової кислоти, накопичення малонового діальдегіду та інгібування окисної модифікації білка, але й власне нейропротективного впливу досліджуваної сполуки, яка охарактеризована не тільки за показниками виживання та неврологічних порушень, але й за клінічно значущими індикаторами - вмісту аденілових нуклеотидів, рівнем лактату, малату, ізоцитрату та НАДН-малатдегідрогенази. Глибина оксидативного стресу, як провідного ушкоджуючого фактору при даній патології, а також ефективності антиоксидантних систем була оцінена у тканинах мозку експериментальних тварин за вмістом окислювальної модифікації білків, активністю NO-синтази, глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази та каталази. Особливо слід відмитити, що автором також був охарактеризований морфофункціональний стан нейронів за експресією c-fos білка імуногістохімічними та імунофлюоресцентними методами. Дослідження проведені на великій кількості експериментальних тварин (453 білих безпорідних щурів, розпліднік ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України») з дотриманням біоетичних норм, а результати піддані статистичній обробці, що дозволило дисертанту викласти обґрунтовані висновки.

На підставі вищезазначеного можна заключити, що висунуті автором наукові положення є обґрунтованими, результати достовірні та логічно випливають з отриманого та проаналізованого експериментального матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані.

5. Наукова новизна роботи

В роботі вперше отримані показники, що характеризують антиоксидантну активність похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-гіоацетатних кислот а також 3-R-гідроксиметилксантинів (загалом 52 сполуки). Автором визначено, що гідрозид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти (С-3) в досліджах *in vitro* (за інгібуванням NO, за інгібуванням окислювальної модифікації білка, та за

інгібуванням Fe^{2+} -залежного ВРО) за силою антиоксидантної активності перевершує референс-препарати (тіотриазолін, дибунол та N-ацетилцистеїн).

Також вперше на моделях ГПМК (двухсторонній перев'язці загальних сонних артерій та внутрішньомозкового введення аутокрові) встановлена нейропротективна активність сполуки С-3, яка спрямована на гальмування оксидативного нітрозуючого стресу, нейроапоптозу, підвищення щільності нейронів IV-V шарів кори головного мозку, активності антиоксидантних ферментів, активації компенсаторних шунтів продукції АТФ, та, як наслідок, зменшенню летальності та неврологічних порушень у експериментальних тварин. Встановлено перевагу С-3 перед тіотриазоліном, цитиколіном і мексидолом.

6. Практичне значення результатів роботи.

До найбільш суттєвих практично значущих результатів роботи слід віднести отримання результатів експериментального дослідження нейропротективної сполуки гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти, що є обґрунтуванням для подальшого поглибленого дослідження сполуки в якості потенціального лікарського препарату для комплексної терапії мозкових інсультів. Також автором показана перспективність пошуку нових антиоксидантів і нейропротекторів в ряду похідних ксантініл-7-ацетатних і ксантініл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметілксантінів.

7. Структура роботи.

Дисертаційна робота викладена на 224 сторінках та побудована у форматі із дотриманням сучасних вимог ДАК, огляду літератури, розділу з переліком матеріалів, реактивів та використаних у дослідженні методів дослідження, трьох розділів, що присвячені власним дослідженням, аналізу та узагальненню результатів експериментальної роботи, висновків, списку джерел літератури, які були використані при підготованні роботи, а також додатків.

У **вступі** наведена стисла інформація про роль активних форм кисню у патогенезі станів пов'язаних з порушенням мозкового кровообігу, залученості окремих систем у цих процесах та підходах щодо корекції цих станів за допомогою антиоксидантів та нейропротекторів. Автором приділено, зокрема, увагу похідним ксантину, як потенційним структурам з антиоксидантною та нейропротективною активністю, для деяких з яких вже була встановлена вказана активність. Наведені дані дозволили обґрунтувати актуальність та перспективність обраного напрямку дослідження.

Аналіз джерел літератури, у якій висвітлені основні молекулярно-біохімічні механізми нейронеструкції, підходи до нейропротекції та місце похідних ксантину серед нейропротекторів, здійснений в **огляді літератури**. Охарактеризовані основні етапи розвитку ушкоджувальної дії та факторів, що приймають в ній участь, при гострому порушенні мозкового кровообігу, починаючи від метаболічного ацидозу внаслідок активації анаеробного гліколізу та розвитку ексайтотоксичності за рахунок NMDA та AMPA систем до порушення енергетичного балансу нейронів, гальмування дихання у мітохондріальному ланцюзі, ролі іонів кальцію у подальших процесах ішемічного пошкодження мозку, до власне розвитку оксидативного стресу з утворенням цитотоксичних низькомолекулярних продуктів.

Використання реагентів, приладів, маніпуляції з тваринами та методики експериментальних досліджень наведені у **другому розділі**. Дисертантом використано як методи *in vitro* для попередніх скринінгові досліджень (оцінка антиоксидантної активності по пригніченню утворення активних форм оксиду азоту та накопичення малонового діальдегіду, а також визначення маркерів окисної деструкції білків), так й методи *in vivo* (моделювання гострого порушення мозкового кровообігу по ішемічному типу чи внутрішньомозкового крововиливу), при використанні яких було визначено середню летальну та середню ефективну дозу сполуки - лідера, визначеної у попередніх скринінгових дослідженнях. Слід відзначити комплекс методів функціональної та морфологічної оцінки розвитку патології та відновлення - використання

шкали McGrow, що є поширеною у експериментальній медицині для оцінки важкості стану тварин, характеристика функціональної активності мітохондрій (ступінь відкриття мітохондріальних пор), візуалізація стану нейронів головного мозку у морфологічних та гістохімічних дослідженнях та їх кількісна оцінка (густина нейронів, клітинний склад в області IV–V шару кори, вміст РНК у нейронах, ступінь експресії c- Fos білку тощо). Зазначені методи дозволили автору отримати експериментальні дані, які, після відповідного належного статистичного аналізу були сформовані для подальшої інтерпретації у подальших розділах.

Розділ **третій** містить інформацію про результати скринінгових досліджень антиоксидантної активності в ряду похідних 3-алкіл(арил)ксантинів в умовах *in vitro*. Так, при реєстрації інгібування NO[•]-радикалу автором була показана висока активність ксантиніл-7-ацетатних, ксантиніл-8-тіоацетатних кислот, а також їх функціональних похідних та виявлено певні закономірності між активністю досліджуваних сполук та їх будовою (позиція замісників, довжина вуглеводневого ланцюга, наявність вторинної аміногрупи у положенні “8”). У моделі інгібування окислювальної модифікації білку найбільша антиоксидантна активність виявлена у похідних гідразидів та бензиліденгідразидів ксантиніл-7-оцтових кислот та встановлено, що найбільший вплив на активність сполук у цій моделі мають замісники у положеннях “7” та “8” та наявність сульфуру. Також у розділі представлені дані по одному з класичних тестів - інгібування утворення малонового діальдегіду у супензії лецитину, де також була продемонстрована висока антиоксидантна активність досліджуваних сполук. На підставі отриманих даних було визначено перспективну сполуку-лідер, що у найбільшому ступені виявляє антиоксидантні властивості у вказаних моделях - гідразид-8-бензиламінотеофілініл-7-ацетат (у подальшому за шифром С-3).

Результати експериментальних досліджень по вивченню нейропротективної дії гідразиду-8-бензиламінотеофілініл-7-ацетату на моделях гострого порушення мозкового кровообігу наведені у **четвертому розділі**.

Попередньо автором було охарактеризовано гостру токсичність сполуки при її пероральному введенні та встановлено її належність до IV класу токсичності, а на моделі однобічної перев'язки загальної сонної артерії за показником вмісту нітритирозину у сироватці крові та активності креатинфосфокінази визначені порогова терапевтична доза (25 мг/кг) та оптимальна (100 мг/кг) терапевтична доза сполуки С-3. Оцінка проявів неврологічного дефіциту дозволила автору кількісно охарактеризувати нейропротективну дію досліджуваної сполуки у порівнянні з такими референтними препаратами, як тіотриазолін, мексидол та цитиколін та встановити її ефективність у відношенні до різних ланок розвитку оксидативного стресу. Слід відмітити, що автором проведено поєднаний аналіз декількох показників антиоксидантної системи організму (супероксиддісмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза) та характеристик енергетичного обміну головного мозку та стану мітохондрій, на підставі чого можливо було всебічно охарактеризувати перебіг патологічних процесів у мозку та динаміку його корекції при застосуванні досліджуваної сполуки. Окремо слід відзначити морфофункціональні дослідження стану нейронів кори головного мозку в умовах моделювання ішемії та мозкового крововиливу при введенні досліджуваної та референтних сполук. Такий підхід дозволив встановити зміни, що мають місце під впливом сполук, та візуально їх відслідкувати, й як і зниження вмісту білку c-Fos, який виступає одним з головних факторів апоптозу, тобто оптимального впорядкованого процесу припинення життєдіяльності клітини. Як одним з цінних результатів проведених експериментальних досліджень було підтвердження положення, що антиоксиданти надають нейропротективну дію в умовах гострого порушення мозкового кровообігу, що є експериментальним обґрунтуванням їх подальшого поглибленого вивчення. На моделі внутрішньочерепного крововиливу показана ефективність сполуки С-3 у гострий період патології та її позитивний вплив на прояв неврологічної симптоматики, а також на енергетичний обмін у головному мозку, зокрема, на зменшення анаеробного гліколізу.

Узагальнення та аналіз експериментального матеріалу, отриманого при проведенні дослідження, наведено у наступному розділі. Автором проведено порівняння отриманих власних експериментальних результатів із вже відомими даними з літературних джерел, компіляцію та узагальнення, а також, на підставі вже відомих механізмів патогенезу ішемічного інсульту та ролі у ньому оксидативного стресу обґрунтувати доцільність застосування похідних ксантину у якості антиоксидантів-нейропротекторів. Загалом, було продемонстровано, що сполука С-3 зменшує утворення АФК в мітохондріях, за рахунок стабілізації ланцюга перенесення електронів і збереження окисної продукції енергії, та, знижуючи гіперпродукцію супероксидрадикала і пероксинітриа, попереджає окислювальну модифікацію білкових структур рецепторів, іонних каналів, ферментів, факторів транскрипції.

8. Повнота викладання матеріалу дисертаційної роботи у наукових публікаціях.

Повнота оприлюднення отриманих експериментальних даних підтверджена наведеним у дисертаційній роботі списком наукових публікацій, у яких повністю відображені та оприлюднені у наукових виданнях та на достатній кількості конференцій як результати дослідження, так й узагальнюючі висновки, що висуваються на захист.

Загалом за результатами досліджень опубліковано 26 наукових робіт, у тому числі 7 статей у фахових журналах України, тези 19 доповідей у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 2 патенти України.

Автореферат повністю відображує зміст дисертації.

9. Зауваження

Структура та викладання дисертаційної роботи відповідають сучасним вимогам відносно структури, змісту та технічного оформлення. Проте, при ознайомленні з роботою виникли деякі зауваження:

1. Малоновий діальдегід є кінцевим продуктом деградації ліпідів. Слід було б також оцінити накопичення гідроперекисей, як першого проміжного продукту реакції перекісного окислення у застосованій модельній системі.
2. У завданні “2” більш доцільним було б використання слова “встановлення” замість “вивчення” при визначенні величин LD_{50} та ED_{20} досліджуваної сполуки;
3. У завданнях “3” та “4” не вказаний вид експериментальних тварин.
4. На жаль, у роботі присутня деяка кількість орфографічних помилок та некоректно перекладених термінів.

Втім, наведені зауваження не торкаються змісту роботи та ніяким чином не зменшують її наукової цінності та актуальності.

Також при ознайомленні з роботою виникла низка **запитань**:

1. В цілому у якій з моделей патології досліджувана сполука С-3 показала найкращі результати та чому? Чи є це обмеженням до використання, чи, навпаки, аргументами для подальших цільоспрямованих досліджень?

2. Чим можна пояснити, що розгалуження естерних радикалів естерів тіоксантинових кислот на моделі інгібування окислювальної модифікації білка *in vitro* призводить до зниження активності відповідальних сполук, оскільки відомо, що зазвичай розгалуження замісників стабілізує проміжні вільні радикали та сприяє підвищенню антирадикальних властивостей сполук?

3. Автором було зазначено, що антиоксидантна дія сполуки С-3 реалізується за допомогою протективної дії щодо ГПР та СОД та забезпечення їх високої активності в умовах оксидативного і нітрозуючого стресу. Якими можуть бути ймовірні механізми реактивації цих типів ферментів?

Висновок

Дисертаційна робота Носач Світлани Григорівни на тему «Цілеспрямований пошук нейропротективних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантину» є самостійною та завершеною

науковою працею, яка присвячена одному з актуальних завдань сучасної фармакології – створенню ефективних медикаментозних засобів лікування порушень мозкового кровообігу на основі похідних 3-алкіл(арил, аралкіл)ксантину. Результатом роботи є експериментальне обґрунтування в досліджах *in vitro* та *in vivo* використання сполуки 8-бензіламініотеофілін-7оцтової кислоти в якості нейропротектора з антиоксидантним механізмом дії.

За актуальністю обраної теми, методичним рівнем досліджень та науково-практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота Носач Світлани Григорівни на тему «Цілеспрямований пошук нейропротективних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантину» відповідає п.11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Доктор біологічних наук,
Завідувач лабораторії фізико-хімічної фармакології
відділу медичної хімії
Фізико-хімічного інституту
ім. О.В.Богатського НАН України

В.Б. Ларіонов

Вчений секретар
Фізико-хімічного інституту
ім. О.В. Богатського НАН України,
к.х.н.



Є.В. Шабанов