

ВІДГУК

офіційного опонента
на дисертаційну роботу Літвіненко Дмитра Федоровича
“Пошук потенційного антигіпоксанта серед нових координаційних сполук германію та дослідження його фармакокінетики”, яку подано до спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 - Фармакологія

1. Актуальність обраної теми дисертаційної роботи.

Проблеми гіпоксії та пов'язаних з нею патологічних станів привертають увагу дослідників впродовж тривалого часу. Недостатня насиченість тканин та органів киснем не тільки є наслідком недостатнього його надходження, але й, як порочне коло, викликає суттєві зміни у біохімічних реакціях, як основних (зниження активності циклу Кребсу, накопичення відновлених еквівалентів та лактату, тканинний ацидоз та інші), так й вторинних, що виникають за рахунок пригнічення функціонування органів та систем (порушення роботи нирок та печінки). У основні характерних для всіх форм гіпоксії порушень є недостатність мітохондріального окислюваного фосфорилування, що викликана зниженням надходження кисню до мітохондрій. Дефіцит енергії обумовлює якісно однотипні метаболічні та структурні зсуви - зменшення концентрації АТФ, гальмування ключового ферменту гліколізу - фруктокінази, накопичення лактату та розвиток ацидозу, а також викликає необоротні зміни клітин організму, насамперед нейронів та клітин серця. Корекція цих порушень можлива при використанні антигіпоксантів - препаратів, які попереджують або усувають порушення, викликані кисневою недостатністю. Арсенал клінічних засобів для корекції гіпоксичних станів включає різні сполуки, як прямої (антиоксиданти - вітамін Е, аскорбінова кислота, флавоноїди, убіхінони, сукцинатвмісні та сукцинатутворюючі сполуки - бурштинова кислота, конфумін, макроергічні сполуки), так й непрямой дії (засоби для наркозу, нейролептики, транквілізатори тощо). З цього боку привертають увагу комплексні сполуки перехідних металів, що містять у своїй структурі як іони

комплексоутворювача, здатного нейтралізувати активні радикали, які утворюються при гіпоксичних станах, так й ліганди органічних сполук, що є субстратами та безпосередніми учасниками/субстратами зазначених біохімічних ланцюгів.

З огляду на це дисертація **Літвіненка Дмитра Федоровича**, присвячена пошуку потенційного антигіпоксанта серед нових гетерометалічних координаційних сполук з різними металами й біолігандами, є обґрунтованим з точки зору експериментальної фармакології дослідженням, а мета роботи, яка полягала у вивченні фармакокінетичних та токсикологічних параметрів сполуки-лідера, є актуальною та практично необхідною.

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

Дисертація виконана, як фрагмент науково-дослідної роботи відділу фармакокінетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» у межах теми «Вивчення залежності між параметрами фармакокінетики, токсикометрії та хімічною будовою оригінальних координаційних сполук германію з різними металами та біолігандами» (№ держреєстрації 0116U006004, 2016-2018 рр.).

3. Особистий внесок здобувача.

Спільно з науковим керівником було визначено мету та завдання роботи, методичні підходи здійснення дослідження, їх теоретичну обґрунтованість. Аналіз джерел літератури, патентно-інформаційний пошук, підготовку огляду літератури здійснено автором самостійно, так само, як й виконання експериментальної частини роботи, статистичної обробки результатів, узагальнення та оформлення у вигляді висновків та підготовки наукових статей за змістом дисертації. Співавторами статей була надана консультативна допомога з теоретичних та методичних питань теми дослідження. Кількісне визначення ОКАГЕРМ-4 в крові та органах щурів проведено на базі

біоаналітичної лабораторії ТОВ «Клініко-діагностичний центр "Фармбіотест"» (м. Рубіжне) при методичній та консультативній допомозі її співробітників.

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

Попереднім аналізом більш ніж 360 публікацій вітчизняних та іноземних авторів, присвячених різним аспектам гіпоксії - як викликаних ними патологічних станів, так й шляхів фармакокорекції, Літвіненком Д.Ф. було визначено напрямок дослідження - пошук антигіпоксантив серед оригінальних координаційних сполук германію. Висвітлення стану проблеми, аналіз можливих механізмів дії дозволив не лише обґрунтувати мету та завдання дослідження, але й побудувати чіткий та логічний план експериментальної роботи, та на підставі послідовного аналізу отриманих даних сформулювати наукові положення у вигляді висновків.

Отримані автором показники токсикологічні характеристики оригінальних координаційних сполук германію та проведення первинного фармакологічного скринінгу на моделі гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією дозволили попередньо визначити перспективну з точки зору безпеки сполуки - манган(II) тартратогерманат(IV), для якої у подальшому було встановлено комплекс фармакокінетичних параметрів як на здорових тваринах, так й в умовах патології гіпоксії закритого простору. На підставі математичного моделювання автором було запропоновано оптимальний режим дозування сполуки ОКТАГЕРМ-4.

Дослідження проведені на значній кількості експериментальних тварин (312 білих статевозрілих безпородних щурів, розплідник ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України») з дотриманням біоетичних норм, статистична обробка отриманих результатів була обґрунтованою та використовувала як параметричні, так й непараметричні методи статистичного аналізу залежно від вихідних експериментальних даних, що дозволило дисертанту зробити обґрунтовані висновки.

Враховуючи вищезазначене можна заключити, що наукові положення дисертаційної роботи є обґрунтованими, достовірні та логічні результати логічно сформовані на підставі отриманого та належним чином проаналізованого експериментального матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані.

5. Наукова новизна роботи

Автором вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено високу в порівнянні з референтним препаратом мексідолом (2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат, армадін), протигіпоксичну активність оригінальної координаційної сполуки на основі германію та винної кислоти з марганцем (манган(II) тартратогерманат(IV)) на моделі гіпоксії замкнутого простору.

Отримано нові дані щодо безпечності манган(II)тартратогерманату(IV) (ОКАГЕРМ-4) на щурах, які екстрапольовано на людей, що дозволяє прогнозувати безпечність сполуки при парентеральному введенні.

Вперше на підставі даних експериментально-математичних дослідів розроблено режим дозування ОКАГЕРМ-4 у якості засобу лікарської профілактики гіпоксичного ураження за умов замкнутого простору.

Уперше проведено комплексний порівняльний фармакокінетичний аналіз протигіпоксичної дії потенційного антигіпоксанта, що вивчається на етапах його абсорбції, розподілу по органам і тканинам та елімінації. Отримані фармакокінетичні параметри ОКАГЕРМ-4 у нормі та при формі гіпоксичного синдрому, що моделюється, сприяють поглибленню існуючих уявлень про можливі механізми реалізації протигіпоксичної активності координаційної сполуки германію, яка включає мікроелемент та біоліганд.

Результати всебічного комплексного дослідження ОКАГЕРМ-4 можуть слугувати теоретичною та експериментальною основою для проведення подальшого доклінічного вивчення та розробки дизайну клінічного

випробування як засобу фармакопрофілактики виникнення та формування гострих киснедефіцитних станів різного генезу.

6. Практичне значення результатів роботи.

Перш за все практична значущість дисертаційної роботи полягає у отриманні експериментальних даних, що підтверджують високу протигіпоксичну ефективність сполук - гетерометалічних координаційних сполук германію з лігандами тартрату та цитрату. На підставі визначених показників токсичності сполук продемонстровано їх високу безпечність, що є важливим при їх потенційному впровадженні у медичну практику. Доцільність та перспективність подальших фармакологічних досліджень була продемонстрована результатами експериментальної оцінки профілактики та лікування наслідків гострої гіпоксії, за якими була виявлена сполука манган(II) тартратогерманат(IV), що серед досліджуваних сполук проявляла найбільшу активність.

До загальних практично значущих результатів роботи можна віднести отримання даних про фармакологічну активність, як антигіпоксантив, у ряду комплексних сполук, що містять германій та 3d- метали, що може слугувати науковим обґрунтуванням цілеспрямованого синтезу нових координаційних сполук германію як потенційних антигіпоксантив та їх дослідженню з подальшим розширенням арсеналу засобів системи надання екстреної та невідкладної медичної допомоги при аваріях, катастрофах та й у військовій медицині.

Практична значимість результатів роботи підтверджена отриманням деклараційного патенту України на корисну модель № 110014 (2016) «Застосування германійвмісної координаційної сполуки манган тартратогерманат (IV) з біологічно активним органічним лігандом винною кислотою, що має виражений антигіпоксичний ефект».

7. Структура роботи.

Дисертаційна робота викладена на 215 сторінках (з яких 145 сторінок основного тексту), побудована у форматі із дотриманням сучасних вимог ДАК та складається зі вступу, огляду літературних джерел, розділу “Матеріали та методи”, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальненню отриманих експериментальних даних, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків.

У **вступі** автором проаналізовано стан проблеми гіпоксії, зокрема, гіпоксичної гіпоксії в поєднанні з прогресуючою гіперкапнією, визначено актуальність пошуку та дослідження антигіпоксичних засобів для розширення арсеналу клінічної фармакології серед координаційних сполук германію з різними біолігандами та вивчення їх фармакокінетики з метою обґрунтованого створення та вибору оптимальних фармакотерапевтичних схем їх можливого застосування. На підставі наведеної інформації сформульовано мету та завдання дослідження.

Огляд літератури містить сучасні уявлення про основні ланки патогенезу гіпоксичної гіпоксії, залучення біохімічних реакцій енергетичного обміну у розвитку негативних ефектів, характеристики порушення, індикатори прогнозування та компенсаторних реакцій систем організму у цьому стані. З урахуванням наведених механізмів патогенезу гострого гіпоксичного синдрому висвітлено сучасні підходи до його профілактики та фармакотерапії та препарати, які використовуються у клінічній практиці, а також підкреслено необхідність полімодального характеру дії перспективних антиоксидантів. Відповідно до мети дисертаційної роботи у огляді літератури приділено увагу також й координаційним сполукам германію та їх застосуванню у фармакотерапії гіпоксичних станів - як власне моногерманієвих комплексів, так й його гетерометалічних комплексів. Слід особливо підкреслити проведений автором аналіз запропонованих механізмів дії даних сполук - впливу на мітохондріальний та мікросомальний електрон-транспортний

ланцюги, антиоксидантну дію за рахунок підвищення активності супероксиддісмутази, каталази, глутатіонпероксидази та ін.

У розділі **“Матеріали та методи”** автором перелічено досліджувані сполуки (цитратні та тартратні комплекси германію та есенціальних мікроелементів), тварин (нелінійні щури) та маніпуляції, яким їх піддавали, токсикометричні показники, на підставі яких у подальшому проводилась порівняльна характеристика сполук, що вивчались. Для фармакокінетичних досліджень сполуки лідера з оптимальним співвідношенням антигіпоксичних властивостей та токсикометричних показників визначено внутрішні органи, для яких у подальшому визначено фармакокінетичні параметри з віднесенням до окремих камер фармакокінетичної моделі. Параметричні та непараметричні статистичні методи, використані у дослідженні, є загальноприйнятими, а їх вибір ґрунтувався на попередньому аналізі первинних експериментальних даних на відповідність до нормального розподілу. Загалом, комплекс використаних підходів та методик дозволив отримати та належним чином обробити дані експериментальних досліджень для подальшої інтерпретації.

У **третьому** розділі наведені отримані експериментальні дані з порівняльної токсикології досліджуваних гетерометалічних цитратних та тартратних комплексів германію (клінічні ознаки отруєння, ступінь загибелі тварин), розраховані величини показників токсичності, проаналізовано залежність розвитку токсичного ефекту від введеної дози, та припущено, що будова органічних кислот (біолігандів), які входять у структуру комплексних сполук, чинить різноспрямовану дію на токсичність сполук.

Експериментальні дослідження антигіпоксичної активності координаційних сполук германію у скринінгових дослідженнях на щурах представлені у розділі **четвертому**. За абсолютними та відносними (у порівнянні з референтним препаратом - армадіном) параметрами антигіпоксичної дії було визначено сполуку-лідера - ОКТАГЕРМ-4, яка може розглядатись як потенційний профілактичний засіб при гіпоксії замкнутого простору.

У п'ятому розділі автором було проведено математичний аналіз залежності антигіпоксичного ефекту ОКТАГЕРМУ-4 від введеної дози та обрано експериментально обґрунтований режим дозування сполуки, що, за думкою автора, забезпечує найбільш оптимальний фармакологічний ефект та у подальшому був обраний для подальших фармакокінетичних досліджень.

До шостого розділу увійшли порівняльні дослідження фармакокінетики ОКТАГЕРМУ-4 в нормі та за умов перенесення гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією. На підставі визначення концентрацій германію у біооб'єктах (кров, нирки, серце, мозок, печінка та ін.) було запропоновано двокамерну модель розподілу сполуки в організмі при її внутрішньоочеревинному введенні. Було встановлено високу швидкість надходження сполуки до системного кровообігу з черевної порожнини, певний вплив на величину максимальної концентрації (за рахунок, як припускається, перерозподілу кровообігу внаслідок захисно-компенсаторних механізмів). Розподіл сполуки в організмі було охарактеризовано за допомогою параметрів напіврозподілу, констант швидкості прямого та зворотного масопереносу, уявного об'єму розподілу та інтегральної характеристики - площі під фармакокінетичною кривою у плазмі крові та наголошено, що ці параметри на зазнають статистично значущої різниці у нормальному стані та у порівнянні з патологією, яка загалом має мінімальний вплив на процеси масопереносу ОКТАГЕРМУ-4 в організмі щурів. Втім, статистично вірогідні відмінності були визначені для певних фармакокінетичних показників головного мозку, легенів та печінки, що було пояснено переважним впливом на кровообіг в органах. За даними елімінації автором було визначено, що незалежно від наявності в організмі гіпоксичних змін, процес елімінації ОКТАГЕРМУ-4 з центральної камери відбувається приблизно однаково.

При аналізі та узагальненні результатів, проведеному автором у сьомому розділі, здійснено компіляцію отриманих експериментальних даних, їх порівняння із контрольними значеннями, інтерпретацію з врахуванням описаних у наукових джерелах ланок патогенезу гіпоксії та її впливу на

системи організму. У підсумку автором зазначено, що гіпоксія на тлі гіперкапнії у певному ступені модифікувати кінетику потенційного антигіпоксанта.

8. Повнота викладання матеріалу дисертаційної роботи у наукових публікаціях.

Список наукових праць, наведений у дисертаційній роботі, підтверджує повноту відображення та оприлюднення отриманих експериментальних даних та узагальнюючих висновків, які висуваються на захист, у наукових виданнях та на достатній кількості конференцій.

Загалом за результатами досліджень опубліковано 15 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових виданнях у галузі медицини, рекомендованих МОН України (4 статті – у фахових виданнях України, 2 статті у закордонних виданнях), тези 8 доповідей у матеріалах конгресу та конференцій з міжнародною участю. Одержано 1 патент України на корисну модель.

Автореферат повністю відображує зміст дисертації.

9. Зауваження

Структура та викладання дисертаційної роботи відповідають сучасним вимогам відносно структури, змісту та технічного оформлення. Окремо слід відзначити високий рівень підготовки автором тексту та стилю викладання дисертаційної роботи, ретельно підготовленої та оформленої. Проте, при ознайомленні з роботою виникли деякі **зауваження**:

- на стор. 83 зазначено, що екстрапольовані дані “практично віддзеркалюють токсикометричний дизайн сполук у ряду, що вивчається”. Ймовірно, сенс цього речення полягає у тому, що екстрапольовані величини LD_{50} відповідають аналогічним параметрам, визначеним на тваринам. Однак, це є природнім, оскільки перерахунок відбувається за допомогою одного алометричного коефіцієнту, отже зміна показників є паралельною. Відповідно, ще не може “ще раз доводити відносну нешкідливість” сполуки.

- Дизайн експерименту з визначення фармакокінетики ОКТАГЕРМУ-4 в умовах патології описаний недостатньо та нечітко. Виходячи з наведеної інформації можна вважати, що оцінюється вплив експериментальної патології лише за 40 хвилин до виведення тварин з експерименту.

- Дані з оцінки гострої токсичності сполук слід було б представити у вигляді кривих виживання, фіксуючи тривалість життя тварин після введення. Це дало б змогу у динаміці відстежити розвиток токсичної дії (летального ефекту) та зробило б дані табл. 4.3 більш легкими для сприйняття.

- Перш за все, чому були обрані саме ці математичні моделі? Не є зрозумілим, чому апроксимація на параболічну залежність по трьом точкам привела к такому низькому коефіцієнту апроксимації, оскільки відомо, що через три точки можна провести одну та тільки одну параболу.

- Досить суперечливим виглядає використання інтерполяційної моделі при аналізі залежності антигіпоксичної залежності ОКТАГЕРМУ-4 від його дози, з використанням функції косинусу, оскільки вона є періодичною та має обмежене фізичне підґрунтя для аналізу показників ефекту (табл. 5.2). Більш доцільним є використання логістичних (при досягненні максимального ефекту), або квадратичних (при наявності максимуму) функцій. До того ж, використання лише трьох точок для побудови моделі без належного обґрунтування із залученням фізіологічних процесів є сумнівним. Не вказані довірчі інтервали для розрахованих параметрів моделей та прогнозних значень часу життя та дози.

- При дослідженні гострої токсичності сполук можна було б порекомендувати провести хоча б обмежений варіант тесту Ірвіна, який є неназивним та дозволяє більш широко охарактеризувати вплив токсичних доз сполук на центральну нервову систему. Також було б доцільно згрупувати інформацію про клінічні ознаки при дослідженні гострої токсичності сполук за їх важкістю та часом спостереження.

Однак, наведені зауваження не торкаються змісту роботи та не зменшують її практичної актуальності та цінності отриманих результатів.

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

1. Чим обґрунтований вибір у якості референтного препарату мексідолу (армадіну)? Оскільки автором було зазначено, що за клінічними характеристиками розвитку токсичної дії сполуки біли подібні до оксибутірату натрію, чи не було б більш доцільним використовувати його у якості основного або додаткового препарату порівняння?

2. Чи досліджувались показники периферичної гемодінаміки пі впливом ОКТАГЕРМУ-4 у здорових тварин та в умовах патології?

3. Чи існують взагалі у клінічній практиці металовмісні (координаційні) антиоксиданти та які потенційні органічні ліганди, на думку автора, можуть бути використані для створення такого роду сполук з урахуванням отриманих у дослідженні результатів?

Висновок

Дисертаційна робота Літвіненка Дмитра Федоровича «Пошук потенційного антигіпоксанта серед нових координаційних сполук германію та дослідження його фармакокінетики» є самостійною та завершеною науковою працею, що виконана на високому методичному та науковому рівні.

Присвячена одному з важливих та актуальних напрямків сучасної фармакології, яким є пошук та вивчення нових потенційних агентів фармакопрофілактики гострої гіпоксії з гіперкапнією, робота містить нове вирішення цієї проблеми, що полягає у теоретичному та експериментальному обґрунтуванні доцільності застосування нової координаційної сполуки германію – манган(II) тартратогерманат(IV) як високоефективного протигіпоксичного засобу

За актуальністю теми, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів робота повністю відповідає п.11 Положення про Порядок присудження наукових ступеней і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого Постановою кабінету Міністрів

України № 567 від 24.07.2013 р. щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, а її автор заслуговує присвоєння наукового ступеня за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія (медичні науки).

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