

ВІДГУК

Офіційного опонента, професора кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця доктора медичних наук професора Горчакової Надії Олександрівни

на дисертаційну роботу Носач Світлани Григорівни «Цілеспрямований пошук нейропротективних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантинів», представленої до спеціалізованої Вченої ради Д.26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології і токсикології» НАМН України на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю фармакологія – 14.03.05

Актуальність. Поширеність ішемічних і геморагічних пошкоджень мозку вимагає пошуку засобів, спроможних впливати на різні молекулярні та біохімічні механізми, спрямовані на зменшення пошкодження нейронів. Незважаючи на певні успіхи, досягнуті в лікуванні захворювань, що супроводжуються порушеннями мозкового кровообігу, проблема створення ефективних нейропротекторів з новим механізмом дії, що дозволить підвищити персоніфікацію лікування, залишається актуальною. Відомо, що гостре порушення мозкового кровообігу призводить до змін показників прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, системи оксиду азоту, енергетичного, іонного обміну, розвитку мітохондріальної дисфункції, окислювального, нітрозуючого стресу. Вищезазначене є підставою для пошуку сполук-антиоксидантів, здатних впливати на патобіохімічні мішені, які залучені у розвиток порушень гомеостазу нервової системи. Саме застосування антиоксидантів, серед яких важливе місце займають похідні ксантину, може стати основою для синтезу препаратів аналогічної будови з нейропротекторною дією при порушеннях мозкового кровообігу. Завдяки фармакологічним властивостям ці сполуки можуть впливати на мозковий кровообіг, проявляти судинорозширювальні, спазмолітичні властивості, покращувати розумову та психічну діяльність.

Дослідженнями співробітників Запорізького державного медичного університету та Національного фармацевтичного університету синтезовані похідні ксантину, у яких встановлена антиоксидантна, кардіопротекторна, антиангінальна дія та можливо прогнозування нейропротекторної активності. У зв'язку з вищезазначеним, дисертаційна робота С. Г. Носач «Цілеспрямований пошук нейропротекторних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантину» є вельми своєчасною та актуальною, адже в ній завдяки проведеним *in vitro* та *in vivo* дослідженням похідних -алкіл(арил, аралкіл) ксантину визначена найбільш активна сполука-лідер – гідразид-8-

бензиламінотеофілінілу, що володіє антиоксидантною та нейропротективною дією.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ.реєстрації 0113U000797; 2013-2015р.р.) та «HP70(HIF-10-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції)»(№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020 р.р.).

Дисертант була співвиконавцем даних НДР.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 220 сторінках комп'ютерного тексту, складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4-х розділів власних досліджень, розділу «Аналіз та узагальнення результатів», висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота проілюстрована 7 рисунками, 37 таблицями. Список використаних джерел містить 294 найменування, з них 193 кирилицею, 101 латиницею.

Оцінка змісту роботи та її завершеність. Розділ дисертаційної роботи «Вступ» розкриває актуальність теми, сучасний стан проблеми патогенезу нейродеструкції головного мозку, в основі якої лежать зміни білкових, ліпідних фрагментів мембрани нейроцитів, порушення метаболізму, розвиток апоптичних, процесів і запальних реакцій, оксидативного та нітрозуючого стресу, що обумовлює когнітивний дефіцит та загибель мозку. Це є підставою для пошуку нейропротекторів з антиоксидантними властивостями, якими володіють, як було показано, похідні ксантину.

В цьому розділі обґрунтовується доцільність проведення експериментальних досліджень, визначена мета, задачі дослідження, перераховані методи дослідження. Об'єкт, предмет дослідження сформовані коректно. Задачі поставлені у відповідності з метою, а саме планування визначення серед похідних ксантину речовин з антиоксидантними властивостями, виявлення серед них сполуки-лідера, яка після проведення необхідних доклінічних досліджень може стати конкурентоспроможним нейропротектором.

Огляд літератури, що є розділом роботи має назву «Сучасна концепція медикаментозної нейропротекції» і складається з 3-х підрозділів: «Молекулярно-біохімічні механізми ішемічної нейродеструкції», «Сучасна нейропротекція. Первинні і вторинні нейропротектори», «Похідні ксантину – перспективні нейропротектори з антиоксидантним механізмом дії».

У другому розділі «Матеріали і методи дослідження» обґрунтовується методичний дизайн дослідження, представлені об'єкти та описані сучасні фармакологічні, біохімічні, морфометричні, імуноферментні, гістоімуно-хімічні, статистичні методи та методи системного аналізу.

Третій розділ «Дослідження антиоксидантної активності *in vitro* в ряду похідних 3-алкіл(арил) ксантинів». Спочатку представлені дослідження антиоксидантної активності сполук по інгібуванню NO-радикалу. В цьому підрозділі встановили, що всі синтезовані речовини, за виключенням Б-ЮРА-61, Б-ЮРА-63, Б-ЮРА-64 в концентрації 10,3 моль/л проявляють значні антиоксидантні властивості та виражено перевищують еталон порівняння АЦЦ. Найбільш вираженою дією володіли сполуки, що мають в 8 положенні вторинну аміногрупу. Це пов'язано з можливістю цих сполук нейтралізувати більшу кількість NO-радикалу, виступати в ролі «спінової» мітки. Надалі досліджували антиоксидантну властивість сполук по інгібуванню окислювальної модифікації білка з метою виявлення глибини патологічного процесу та ступеня підвищення оксидативного стресу. Встановлено, що за інгібуванням показників окислювальної модифікації білку більша ефективність виявлена у сполук, які мають в 8 положенні вторинну аміногрупу і можуть під впливом різних сполук окислюватися з утворенням ненасиченої іліденової системи. Наявність в положенні 8 ксантиніл-8 метилтіоацетатних кислот атому сірки надає дії цих сполук достатньо виражений антиоксидантний потенціал за рахунок окислення даного атому з утворенням SO і SO₂ груп.

Крім того, антиоксидантну активність сполук визначали шляхом неферментативного ініціювання вільного радикального ліпоперокиснення. При цьому в якості біомаркеру був вибраний малоновий діальдегід, а у вигляді субстрату суспензія яєчних ліпопротеїнів. Проведені дослідження антиоксидантної активності досліджуваних сполук показали, що більшість з них володіє цією активністю, а найбільш перспективною речовиною виявився гідразид 8-бензиламінофлініл-7-ацетат під шифром Б-ЮРА-2, яка подальше отримала шифр С-3. Враховуючи роль нітрозуючого стресу в зниженні активності супероксиддисмутази (СОД), а також з метою більш детального вивчення дії С-3, проведені дослідження антиоксидантної активності речовин при моделюванні нітрозуючого стресу. Внесення сполуки С-3 до інкубаційного середовища перед моделюванням нітрозуючого стресу в концентрації 10⁻⁶М вело до пониження деструктивної дії агресивних форм нітроген монооксиду по відношенню до активності СОД. Це дозволило стверджувати, що антиоксидантна дія С-3 реалізується через протективну дію по відношенню до СОД, забезпечує її високу активність в умовах нітрозуючого стресу *in vitro*. С3(гідразид 8-бензиламінофлініл-7-ацетатної кислоти) виявився найбільш активною

сполукою, показав виражені антиоксидантні властивості на всіх трьох моделях стресу, а також можливість виступати в ролі протектора СОД.

В розділі 4 «Вивчення нейропротективної дії гідрозид-8-бензиламінотеофілініл-7-ацетату при гострому порушенні мозкового кровообігу» дослідження почали з визначення гострої токсичності цієї сполуки при внутрішньошлунковому введенні. Внаслідок експериментів визначили ДЛ50, що становила 2100 ± 142 , 8 мг/кг, що дозволило віднести сполуку до IV класу токсичності. Маса органів тварин, що отримали токсичні дози С-3, при цьому перебувала в межах фізіологічної норми. З метою проведення подальших експериментальних досліджень сполуки С-3 визначали її ефективну дозу на моделі одnobічної перев'язки загальної сонної артерії. Критерієм нейропротекторної активності сполуки слугував взаємопотенціальний вплив як на реверсію акумуляції рівня реактивних метаболітів NO, так і на зниження цереброспецифічної фракції КФК у сироватці крові щурів. При введенні С-3 у дозі 100 мг/кг маси реєструвався найбільший клінічний ефект як у зменшенні проявів нітрозуючого стресу, так і у вигляді мембраностабілізуючої дії з пригніченням нейрональної деструкції, зумовленої ішемічними і реперфузійними патобіохімічними змінами в умовах моделювання гострого порушення мозкового кровообігу у щурів. Тому ефективною дозою С-3 для подальших досліджень є доза 100 мг/кг маси тварин.

Дослідження специфічної нейропротективної дії С-3 при порушенні мозкового кровообігу, викликаного двобічною оклюзією сонних артерій, проводили в порівнянні з дією мексидолу, тіотриазоліну та цитиколіну. При гострому порушенні мозкового кровообігу введення С-3 та референт-препаратів щурам мало різний за силою нейропротективний ефект. С-3 в більшій мірі (в 2, 6 рази) понижував виникнення неврологічної симптоматики та летальність тварин, перевищуючи за цими показниками тіотриазолін, мексидол, цитиколін. У контрольних тварин в головному мозку на 4-у добу спостерігалось збільшення продуктів окисної модифікації білків (АФГ, КФГ) та показника нітрозуючого стресу (нітротирозину), що є показником пошкодження функціональних макромолекул. С-3 порівняно з референтними препаратами мав більшу антиоксидантну активність, знижуючи вміст маркерів оксидативного стресу (АФГ, КФГ), а також специфічного маркера нітрозуючого стресу-нітротирозину. При цьому препарати підвищували активність антиоксидантних ферментів-СОД, каталази, глутатіонпероксидази (ГПР). Стійкі порушення нітроксидазної системи на 4-у добу спостерігаються в мозку контрольних тварин з гострими порушеннями мозкового кровообігу, що проявлялося збільшенням концентрації нітритів та активності нітритоксидази. У головному мозку тварин, що отримували

С-3 спостерігалось зниження гіперферментемії синтази оксиду азоту та зменшення рівня нітритів.

За впливом на ці показники С-3 значно перевищує дію мексидолу та цитиколіну. Крім того С-3 при гострій недостатності мозкового кровообігу підвищує вміст антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, ГПР), реалізуючи антиоксидантну дію. Припускають, що нормалізуюча дія під впливом С-3 щодо ГПР пов'язана зі зниженням ушкоджуючої дії активних форм кисню на селен-залежний активний центр ферменту, що узгоджується зі зниженням на 4-у добу гіперферментемії оксиду азоту, коли сполука С-3 при взаємодії з NO-радикалами грає роль «спінової пастки». Механізм взаємодії сполуки С-3 та NO може бути реалізована за рахунок переносу електрона з вищої зайнятої молекулярної орбіталі «спінової пастки» на вакантну нижчу молекулярну орбіталь радикалу з утворенням більш стабільного радикального комплексу. Проміжні метаболіти оксидативного стресу – карбонільовані та нітрозильовані білки, які є вторинними месенжерами при гострому порушенні мозкового кровообігу сприяли відкриттю мітохондріальної пори. Наслідком антиоксидантної дії С-3 і референт-препаратів стала їх мітопротективна дія.

Сполука С-3, що мала найбільший вплив щодо інгібіції окисної деструкції білкових структур мітохондрій головного мозку, найбільш швидко порівняно з референт-препаратами зменшувала швидкість відкриття мітохондріальної пори і набухання мітохондрій при гострому порушенні мозкового кровообігу. Формування мітохондріальної пори веде до порушення енергопродукції в головному мозку, що проявляється зниженням рівня АТФ, АДФ та підвищенням вмісту АМФ на тлі дискоординації компонентів циклу Кребса, про що свідчить зниження рівня малату, ізоцитрату, активності сукцинатдегідрогенази на фоні компенсаторної активації гліколізу, про що свідчить збільшення рівня лактату. Активація окисної продукції енергії під дією С-3 забезпечувало підвищення рівня АТФ, АДФ в головному мозку тварин та пониження рівня АМФ, при цьому нормалізувалася активність анаеробного гліколізу за рахунок зниження вмісту лактату. Введення тваринам сполуки С-3 в умовах церебральної ішемії реалізувало антиоксидантну дію, спрямовану на зменшення оксидативного пошкодження мітохондрій, збереження окисної продукції енергії, активації гліколізу. Встановлений позитивний вплив С-3 на активність малат-аспартатного човникового механізму та сукцинатоксидазного шляху.

С-3, а також референт препарати (тіотриазолін, мексидол, цитиколін) мали виражену нейропротективну спрямованість при лідерстві С-3. Надалі визначений вплив С-3 на морфофункціональні показники нейронів сенсомоторної зони кори головного мозку з моделюванням ішемії та внутрішньомозкового крововиливу. Ішемія призводила до зменшення площі і розміру нейронів в корі. При цьому

визначали деструктивно змінені нейрони (пошкодження клітинної мембрани, зморщування клітини), а також відмічали нейрони з морфофункціональними змінами (порушення розмірів тіл нейронів, накопичення надлишку кількості РНК у клітині). Введення С-3 на 4-у, 18-у добу привело до підвищення щільності і площі нейронів. Ішемія не впливала на щільність гліальних клітин в корі, але достовірно збільшувалася площа гліоцитів і вміст в них РНК, що мало компенсаторний характер. Крім того, в корі мозку збільшилася кількість апоптичних і деструктивно змінених нейронів на 4-добу ішемії, хоча на 18-у добу цей показник знизився.

Найбільшим позитивним нейропротекторним ефектом за показниками морфологічних досліджень препаратів володів С-3. Характер його впливу на нейроглію при гострому порушенні мозкового кровообігу проявляється збільшенням кількості гліальних клітин та нейронів в корі мозку та підвищенням їх морфофункціональної активності (підвищення вмісту РНК). Антиоксиданти (С-3, мексидол, тіотриазолін, а також нейропротектор цитиколін) при гострому порушенні мозкового кровообігу збільшують вміст білку c-Fos, що відбувається на тлі перевантаження та загибелі клітини за типом апоптозу і зменшення некрозу нейронів.

В 5 розділі «Вивчення нейропротективної дії сполуки С-3 при моделюванні внутрішньомозкового крововиливу» показана тяжка ступінь розвитку симптоматики при цієї патології, на 4 добу вижило лише 50% тварин. Введення С-3 щурам з внутрішньомозковим крововиливом знизило летальність тварин на 50% порівняно з групою нелікованих тварин, а також в 4 рази знизило виникнення неврологічної симптоматики на 4-у добу експерименту. На 18-у добу внутрішньо мозкового крововиливу спостерігали неврологічні порушення легкого ступеню важкості. Призначення сполуки С-3 призвело до зниження неврологічної симптоматики за шкалою С.Р.Гроу в 3,15 рази. За цим показником сполука С-3 достовірно перевищувала цитиколін та мала нейропротекторний ефект, що дорівнював впливу тіотриазоліну та мексидолу. При внутрішньомозковому крововиливі зафіксовано підвищення рівня маркеру нітрозуючого стресу-нітротирозину, окисного стресу-АФГ, КФГ у цитозолі головного мозку щурів на 4-у добу експерименту. При цьому паралельно спостерігали пониження активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, ГПР). В даних умовах експерименту спостерігали розвиток стійких порушень енергетичного обміну-падіння рівня АТФ, АДФ, збільшення АМФ на тлі дискоординації показників циклу Кребса- зменшення рівня малату, СДГ, МДГ при компенсаторній активації гліколізу (збільшення вмісту лактату) в тканинах мозку. С-3 в більшому ступеню порівняно з референт-препаратами активував окисну продукцію енергії (підвищення рівня малату, активності СДГ, МДГ), що забезпечило зростання

продукції АТФ на фоні збільшення рівня АДФ, зниження АМФ та зменшення активності анаеробного гліколізу, що сприяло і реалізації мітопротективної дії. Нейропротективна дія С-3 проявлялася стосовно морфологічних показників більш виражено порівняно з референт-препаратами. С-3 збільшував щільність нейронів на 4-у добу, перевищуючи за силою дії тіотриазолін, мексидол, цитиколін. На 18-добу С-3 також підвищував щільність нейронів, перевищуючи мексидол. Нейропротективна дія С-3 на відміну від референт-препаратів реалізувалася в гострому періоді експериментальної патології. Дія С-3 характеризується позитивним впливом на функціональну активність нейронів, про що свідчить достовірне підвищення вмісту РНК в клітинах на 4-у та 18-у добу внутрішньо мозкового крововиливу. В цілому при внутрішньомозковому крововиливі за силою нейропротекторної дії сполука С-3 перевищувала вплив цитиколіну і мексидолу (щодо зниження рівня нітротирозину, АФГ, КФГ, нейроапоптозу, підвищення щільності нейронів, вмісту АТФ, малату, МДГ, СОД, каталази) і тіотриазоліну (щодо підвищення АТФ, щільності нейронів, гальмування відкриття мітохондріальної пори).

В розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» дисертант акцентує увагу на доцільності створення нейропротективних засобів серед похідних 3-алкіл (арил, аралкіл) ксантину, що володіють антиоксидантною дією, пригнічуючи АФК-механізми нейронапоптозу та відновлюючи енергопродукуючі функції мітохондрій.

Висновки, надані дисертантом, в цілому аргументовані та висвітлюють результати експериментальних досліджень, а також відповідають поставленим завданням.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше отримані результати про антиоксидантну активність 52 сполук похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів. Визначено, що гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти (С-3) в досліджах *in vitro* (за інгібуванням NO, інгібуванням окислювальної модифікації білка, та за інгібуванням Fe²⁺-залежного вільнорадикального окиснення) за силою антиоксидантної активності перевершує референт-препарати (тіотриазолін, мексидол і N-ацетилцилцистеїн для комплексної терапії).

Вперше на моделях гострого порушення мозкового кровообігу (двобічної перев'язки загальних сонних артерій та внутрішньомозкового введення аутокрові) встановлена нейропротективна активність С-3, дія якого спрямована на гальмування оксидативного, нітрозуючого стресу, нейроапоптозу, підвищення щільності нейронів IV-V шарів кори головного мозку, активність антиоксидантних ферментів, активацію компенсаторних шунтів продукції АТФ, а також як наслідок, зменшення летальності та неврологічних порушень у

експериментальних тварин. Встановлено перевагу С-3 перед тіотриазоліном, цитиколіном, мексидолом.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати експериментального дослідження нейропротекторної сполуки гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти, показали її переваги стосовно референт-препаратів. Обґрунтовано проведення подальших поглиблених досліджень сполуки в якості потенціального лікарського засобу для комплексної терапії мозкових інсультів. Показана перспективність пошуку нових антиоксидантів і нейропротекторів в ряду похідних ксантиніл-ацетатних та ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідросиметилксантинів. Новизна досліджень підтверджена патентами України. Результати дослідження впроваджені в педагогічний процес і наукову роботу кафедр 5-ти вищих медичних університетів України.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків, рекомендацій, сформованих у дисертації. Проведений аналіз отриманих результатів та літературних джерел доводить доцільність пошуку нейропротективних засобів серед похідних ксантину, що володіють антиоксидантними властивостями. Висновки, надані дисертантом в цілому аргументовані, висвітлюють результати експериментальних досліджень, відповідають завданням.

Повнота викладання результатів в опублікованих роботах. За результатами досліджень опубліковано 26 наукових робіт, в тому числі 7 статей у фахових журналах України, 19 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 2 патенти України.

Недоліки дисертації стосовно її змісту та оформлення. Незважаючи на наукову, практичну значимість, методичне забезпечення при роботі над дисертацією виникають зауваження, побажання.

1. При зазначенні теми слід вказати, що виявлена сполука-лідер, яка при подальшому дослідженні може бути конкурентоспроможною.

2. Першу задачу можна зазначити, як проведення скринінгових досліджень.

3. Наукову новизну необхідно розширити, тому що вона не охоплює всіх вперше отриманих результатів.

4. У розділі «Матеріали і методи дослідження» обґрунтувати необхідність визначення відкриття мітохондріальної пори.

5. Необхідно виправити друкарські помилки та русизми.

У рамках дискусії бажано послухати відповіді на наступні питання:

1. Одним з важливих ланок нейродеструкції при ішемичному інсульті є оксидативний стрес. Які, на Ваш погляд, найбільш перспективні ланки цього

патологічного процесу для дії досліджуваних сполук? Які функціональні групи антиоксидантів похідних ксантину можуть забезпечити вплив на ці ланки?

2. Які фармакологічні властивості були встановлені іншими дослідниками у гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти? Підтвердили вони його властивості скаведжеру NO?

3. Які з проведених вами досліджень відповідають вимогам ДЕЦ МОЗ України до пошуку засобів первинної та вторинної нейропротекції? До якої групи нейропротекторів відноситься гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти?

Висловлені зауваження і питання не понижують наукової цінності та практичного значення рецензованої роботи.

Висновки. Дисертаційна робота Носач С. Г. «Цілеспрямований пошук нейропротективних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантинів» є самостійним, закінченим науковим дослідженням, виконаним на хорошому методичному рівні, містить нове вирішення завдання пошуку нейропротекторів-антиоксидантів в ряду похідних аліл (арил, аралкіл) ксантину в умовах гострого порушення мозкового кровообігу та внутрішньомозкового крововиливу, яке дозволило виявити сполуку-лідера, гідразиду-8-бензиламінотеофілінілу, перспективного для подальших доклінічних досліджень, що відповідає спеціальності-14.03.05-фармакологія.

Робота має практичне значення, тому що обґрунтовує доцільність пошуку нейропротекторів в ряду похідних ксантиніл-7-ацетатних та ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів, що підтверджено патентами України, а також отримані результати досліджень, що впроваджені в педагогічний процес та наукову роботу кафедр медичних і фармацевтичних факультетів вищих медичних учбових закладів України. За актуальністю обраної теми, методичним та науково-практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота Носач Світлани Григорівни на тему «Цілеспрямований пошук нейропротективних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантинів» відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.01.2013 р. №567, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05-фармакологія.

Офіційний опонент
професор кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця,
доктор мед. наук, професор

