

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, доцента НАГОРНОЇ Олени Олександрівни на дисертаційну роботу РИЖЕНКА Віктора Павловича «Оптимізація цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину», поданої до офіційного захисту в спеціалізовану вчену раду Д 26.550.01 Державної установи «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Актуальність теми. Відомо, що більшість поширених захворювань людини, які є лідерами по кількості летальних випадків та інвалідизації населення, а саме: патології серцево-судинної системи, ЦНС, дихальних шляхів, злоякісні новоутворення мають чітко з'ясовану вільнорадикальну природу. Окисна модифікація білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, яка спровокована утворенням надмірної кількості високореакційних радикалів призводить до деструкції цих біомолекул та загибелі клітин. В зв'язку з відкриттям ролі оксидативного стресу в патогенезі багатьох захворювань, в т.ч. і ішемічної природи, у багатьох схемах комплексного медикаментозного лікування знайшли застосування антиоксиданти. На сьогодні, в лікуванні ішемічної хвороби серця, мозкових інсультів, гепатобіліарної системи, алкогольної хвороби в клінічній практиці застосовуються такі антиоксиданти, як мексидол, емоксипін, тіотриазолін, α -токоферол. Однак, наявний арсенал антиоксидантних засобів не задовольняє сучасним вимогам клінічної практики і обумовлює інтенсифікацію розробки і створення нових антиоксидантів. З проясненням ролі NO в патогенезі порушень мозкового кровообігу, хронічної серцевої недостатності, гіпертонічної хвороби, фетоплацентарної недостатності, когнітивних розладів, хвороби Альцгеймера а також в молекулярно-біохімічних механізмах апоптозу, мітохондріальної дисфункції, ендотеліальної дисфункції, ставиться питання про пошук селективних скавенджерів цього радикала.

Тому, дисертаційна робота Риженка Віктора Павловича є вельми актуальною, так як в ній проведено цілеспрямований пошук скавенджерів NO серед похідних ксантину, теоретично обгрунтовано та розроблено математичний підхід до створення та створена комп'ютерна програма віртуального скринінгу. Дослідами *in vitro* та *in vivo* виявлено сполуку гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3). Досліджувалась антиоксидантна та нейропротективна активність сполуки С-3 в дослідах *in vitro*, також вивчалась антиоксидантна та протиішемічна активність С-3 на моделі інфаркту міокарда, моделях робочої гіпоксії в порівнянні з антиоксидантним препаратом мілдронатом. На моделі внутрішньомозкового крововиливу (ВК) досліджувалась антиоксидантна і протиішемічна властивості сполуки С-3 у порівнянні з препаратами мексидол та пірацетам.

Все викладене вище є тим базисним фундаментальним обгрунтуванням актуальності і своєчасності виконання кандидатської дисертації, присвяченої

темі пошуку нових ефективних антиоксидантів серед похідних ксантину для використання в комплексній терапії ішемії міокарда та головного мозку.

Ступінь обґрунтованості наукових питань, висновків, рекомендацій, сформованих в дисертації, достовірність. Дисертаційна робота виконана за планом наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом 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-1α-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020). Дисертант є співвиконавцем даної теми.

Як здобувач наукового ступеня кандидата біологічних наук Віктор Павлович Риженко в своїй роботі спирається на чіткі критерії щодо відтворення окремих патологічних моделей та використання надійних методичних підходів визначення відповідних механізмів патогенезу з одного боку, а з другого – створення програми віртуального скринінгу скавенджерів NO, яка може бути використана для спрямованого пошуку нових високоактивних антиоксидантів серед знову синтезованих сполук, а також для планування синтезу нових речовин з антиоксидантною активністю шляхом прогнозу рівня заданого виду активності. Експериментально встановлений механізм дії похідного ксантину – С-3, що може сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських засобів, що переривають NO-залежні ланки ішемічного пошкодження міокарда та головного мозку.

Результати досліджень, представлених в дисертації, обґрунтовані об'ємним і достовірним матеріалом. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів віртуального скринінгу, фармакологічних, біохімічних, ПЛР в реальному часі, гістоімунохімічних, імуноферментних досліджень, математичної статистики. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає сформульованим цілі та задачам дослідження, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

Загальні відомості про роботу. Логіка самого дослідження і рукопис дисертації побудовані за класичною схемою і складаються з розділів: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження» «Результати власних досліджень», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Перелік використаних джерел».

Повний обсяг дисертації складає 266 сторінок, ілюстрована 25 рисунками, 26 таблицями, 287 посилань, з них 193 – іноземні. За темою дисертації опубліковано 20 наукових робіт, із них 8 статей у фахових журналах України, 12 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю.

Характеристика змісту роботи. Вступ до роботи написано лаконічно із залученням основних посилань на узагальнюючі літературні

джерела. Він є достатнім як з позиції актуальності обраної теми, так і сформульованої мети та завдань досліджень. У вступі охарактеризовано наукову новизну дослідження та її науково-практичну цінність. Наведено дані щодо публікацій та апробації основних, базових результатів досліджень.

Уже в першому розділі роботи (*огляд літератури*) автор охарактеризував сучасний стан проблеми захворювань нервової, серцево-судинної систем, захворювань печінки, легень та ін. Проаналізовано розвиток патологічних змін при цих захворюваннях, які в своєму патогенезі мають вільнорадикальну фазу, наслідком якої є окисна модифікація білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, що призводить до їх деструкції та загибелі. В зв'язку з відкриттям ролі оксидативного стресу в патогенезі багатьох захворювань, в т.ч. і ішемічної природи, у багатьох схемах комплексного медикаментозного лікування знайшли застосування антиоксиданти. Встановлена участь NO в ініціації оксидативного стресу при ішемії міокарда та головного мозку.

Представлений аналітичний огляд різних антиоксидантних засобів, за хімічною структурою та за механізмом дії, які застосовуються в клінічній практиці. В той же час незважаючи на велику кількість наукових досліджень і публікацій щодо застосування антиоксидантів у комплексній терапії різних захворювань, доказової клінічної ефективності у більшості препаратів цієї групи немає. За результатами огляду визначено, що у якості перспективної молекули для конструювання антиоксидантів інтерес представляє ксантин і його похідні.

В той же час розробки і створення високоефективних антиоксидантів та відкриття нових хімічних груп гальмує певна дороговартісність завдання та відсутність існування селективної програми комп'ютерного прогнозу різних видів біологічної активності на основі структури речовин, що належать до різних хімічних класів.

Результати власних досліджень і усі розділи цієї частини рукопису викладено логічно, конкретно, кожна частина дисертації повністю відповідає поставленій меті і заявленим задачам та супроводжуються аналізом і підсумовуючими висновками.

Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень» представлений характеристиками об'єктів та предметів дослідження, характеристиками лабораторних тварин та переліку використаних засобів та методів дослідження. Дисертантом зрозуміло схематично представлений дизайн дослідження. На початкових етапах дисертантом проведений пошук скавенджерів NO *in vitro* та здійснено квантово-хімічні розрахунки серед 122 похідних ксантину. Відібрані 122 сполуки похідних ксантину синтезовані на кафедрі біологічної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувачка – д.хім.н., професор Александрова К. В.).

В подальшому дисертантом проведені розрахунки кореляційної залежності між параметрами квантово-хімічних сполук і антиоксидантної активності по інгібуванню NO. Дослідження завершуються розробкою і створенням програми віртуального пошуку скавенджерів NO. Далі програма проходить тестування та її валідність підтверджується на експериментальних

моделях в дослідках *in vitro* та *in vivo*. В дослідженнях *in vitro* та *in vivo* були застосовані наступні лікарські засоби N-АЦЦ (ацетилцистеїн) – Sandoz, Мексидол (етілметилгідроксипіридину сукцинат) - ЗАО «ЗиО-Здоровье», Пірацетам (2-(2-оксопірролідін-1-ил)-ацетам) - Шрея Лайф Саенсиз Пвт. Лтд., Індія, Мілдронат (мельдоній) - Гриндекс АО (Латвія).

З використанням власних методів програмного забезпечення для оцінки валідності програми віртуального скринінгу з нових 7 – ми синтезованих сполук було відібрано найбільш активну сполуку – гідразид 8-бензіламінінотеофіллініл-7-оцтової кислоти (С-3) з потенційними властивостями скавенджера NO.

Дуже докладно описаний метод оцінки антиоксидантної, нейропротективної активності по інгібуванню NO у похідних ксантину *in vitro*. Для моделювання нітрозуючого стресу використовували динітрозольний комплекс заліза (II)-цистеїна (DNIC). Оцінку антиоксидантної активності досліджуваної сполуки (С-3) проводили на експериментальних моделях ішемії головного мозку та серця. Експериментальна частина виконана на 261 білому безпородному шурі (самки і самці), отриманому з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Для відтворення моделі гострого порушення мозкового кровообігу за геморагічним типом дисертантом використана загальноприйнята нині модель експериментального порушення мозкового кровообігу - внутрішньомозковий крововилив.

Для вивчення показників антиоксидантної та протиішемічної активності відібраної сполуки (С-3) запропонована модель гострого інфаркту міокарда та моделі гострої робочої гіпоксії (при фізичному навантаженні на тредбані та на тлі попереднього введення коронароспастичного агента – пітуїтрина). Також були застосовані електрофізіологічні дослідження. За допомогою біохімічних досліджень оцінювали показники інтенсивності оксидативного стресу, енергетичний обмін, стан нітроксидергічної системи в тканинах головного мозку і міокарда. Для визначення рівня експресії мРНК iNOS і мРНК eNOS проведена полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу. Концентрацію bcl-2 і HSP₇₀ в цитоплазматичній або мітохондріальній фракціях органів (серце, головний мозок) визначали методом Вестерн-блот аналізу. У процесі дослідження проведено квантово-хімічні розрахунки. Аналіз результатів оброблений за допомогою методів математичної статистики.

Розділ 3 присвячений математико-теоретичному обґрунтуванню створення програми віртуального скринінгу. В рамках теоретичного обґрунтування, підбору графічних підходів до програмного забезпечення віртуального скринінгу автором проведений пошук кількісних співвідношень структура-властивість заснований на цілому ряді молекулярних дескрипторів. Показано пріоритетність використання методів квантової хімії для виявлення закономірностей структура-активність, яка дозволяє на більш глибокому рівні описати природу активних фрагментів молекул

досліджуваних сполук. Також досліджено, що використання результатів квантово-хімічних розрахунків на відміну від напівемпіричних (фізико-хімічних методів) дозволяє проводити дослідження для більш репрезентативного ряду потенційних лікарських засобів. Але велика кількість молекулярних дескрипторів потребує значного машинного часу для їх розрахунку та спеціалізованого програмного забезпечення, тому дисертантом була зроблена спроба зменшити кількість молекулярних дескрипторів, необхідних для пошуку потенційних інгібіторів NO-радикалу.

Для пошуку антиоксидантів-скавенджерів NO був взятий один з найбільш активних нітрозуючих агентів NO-радикала – пероксинітрит. Завдяки тому, що з хімічної точки зору пероксинітрит володіє високим окислювальним потенціалом, високою електрофільною і нуклеофільною здатністю, це дозволяє йому реагувати з широким спектром субстратів. Автором продемонстровано різні механізми та шляхи взаємодії пероксинітриту (із субстратами, із алкільними частинами молекул, із метіоніном та з діоксидом вуглецю). Властивість субстратів, особливо висока реакційність субстратів (в контексті пошуку потенційних інгібіторів активних форм нітрогену) є важливим показником для скринінгу. Дисертантом акцентовано, що для спрощення опису особливостей електронної будови молекули необхідно розглядати не всі орбіталі, а тільки вищу зайняту (ВЗМО або НОМО) та нижчу вакантну молекулярні орбіталі (НВМО або LUMO), так звані граничні, і саме вони в першу чергу визначають реакційну здатність молекулярної частинки. За теорією Фукуї індекси реактивності розраховуються з використанням коефіцієнтів граничних орбіталей. Враховуючи вищезазначене дисертантом для подальших досліджень в якості основних дескрипторів були обрані квантово-хімічні показники досліджуваних сполук.

Далі автором проведена розробка математичного підходу до створення комп'ютерної програми віртуального скринінгу. Для виявлення закономірностей зв'язку структура-активність необхідно було розробити схему електронно-топологічного підходу. Для цього дисертантом проведено деякі етапи, такі як дослідження похідних ксантину, створення бази даних по квантово-хімічним параметрам, дослідження АОА по інгібуванню NO, розрахунок кореляційної залежності між параметрами квантово-хімічних сполук і АОА по інгібуванню NO, створення програми віртуального скринінгу на основі алгоритму, що враховує кореляційну залежність квантово-хімічних сполук і АОА по інгібуванню NO, робочі бази з даними з показниками АОА і квантово-хімічних розрахунків (НОМО, LUMO, η , χ , ω) і саме написання програми віртуального скринінгу. Паралельно з цим розраховувались показники енергії граничних орбіталей (НВМО, ВЗМО), які були використані для розрахунку реактивного індексу. Окрім знаходження основного алгоритму, важливим аспектом є архітектура програмного забезпечення, а також платформа для його використання. Автором надано обґрунтування вибору та вирішено реалізувати програмне забезпечення для скринінгу потенційних інгібіторів NO-радикалу у вигляді веб-додатку.

Основний матеріал дисертації викладений в 4-му розділі «Результати дослідження», де автор послідовно представляє результати власних досліджень, їх оцінку, обговорення та проміжні висновки.

4-й розділ присвячений вивченню оцінки антиоксидантної активності (АОА) по інгібуванню $\text{NO}\cdot$ -радикала, квантово-хімічним розрахункам похідних ксантина, встановленню залежності антиоксидантної активності від квантово-хімічних дескрипторів, створенню алгоритму комп'ютерної програми для віртуального скринінгу NO в ряду азагетероциклів, програми віртуального скринінгу скавенджерів NO в ряду азагетероциклів та проведення аналізу залежності активності від квантово-хімічних показників похідних ксантину за допомогою алгоритмів машинного навчання.

Оцінка антиоксидантної активності (АОА) по інгібуванню $\text{NO}\cdot$ -радикала була досліджена вивчаючи властивості поглинача NO похідних ксантину з декількома енергетичними дескрипторами. Здобувачем у розділі представлена тестова вибірка 11 сполук. За твердженням автора всі досліджувані сполуки показали високі антиоксидантні властивості і їх значення в більшості випадків перевищують стандарт – N-ацетилцистеїн (NAC), але найбільш активним серед всіх була вибрана сполука - амоній-3-бензил-8-метилксантинів-7-ацетат 5. Були проведені квантово-хімічні розрахунки похідних ксантину, отримані формули та розраховані необхідні показники (абсолютної жорсткості молекули, абсолютної електричної негативності молекули, реактивного індексу). Була встановлена залежність антиоксидантної активності від отриманих квантово-хімічних дескрипторів (від найнижчої вакантної молекулярної орбіталі та від вищої зайнятої молекулярної орбіталі). В ході аналізу результатів дослідженнями було встановлено, що антиоксидантна активність досліджуваних сполук знаходиться в прямій залежності від реактивного індексу. У зв'язку з цим, подальший прогноз ймовірної активності сполук проводили на підставі лінійної інтерполяції. В подальшому дисертантом був запропонований алгоритм програми віртуального скринінгу. Завдяки цьому алгоритму можливе створення програми для віртуального скринінгу NO в ряду азагетероциклів, яка буде визначати прогнозовану антиоксидантну активність сполук у відсотках. Створення комп'ютерної програми для віртуального скринінгу істотно скоротить час і кошти при дослідженні нових синтезованих сполук. Реалізована програма буде у вигляді веб-додатку. Автором пропонується створити веб-додаток мовою програмування Python. Для вирішення задач регресії дисертантом було перевірено кілька моделей. За результатами аналізу кращою виявилась модель «Гradientного Бустінга», яка в подальшому була застосована.

Розділ 5 відведений оцінці валідності комп'ютерної програми віртуального скринінгу АОА, а також тестуванню знову синтезованих сполук і дослідження їх фармакологічної активності. Оцінку валідності програми віртуального скринінгу проводили на нових 7 – ми синтезованих сполуках. Були оцінені антиоксидантні властивості цих сполук та з використанням моделі "gradientного бустінга" відібрана активна сполука C-3 (гідрозид 1,3-

диметил-8-бензиламіноксантиніл 7-оцтова кислота). Прогнози програми були перевірені експериментально та було підтверджено, що введення в інкубаційне середовище сполуки С-3 в концентрації (10⁻³ моль/л, 10⁻⁵ моль/л) приводило до зменшення концентрації NO. Базуючись на даних попередніх досліджень і результатів програми віртуального скринінгу і для більш поглибленого випробування програми дисертантом було прийняте рішення вивчення антиоксидантної дії С-3 в дослідях *in vivo* на моделях ішемії головного мозку і міокарду.

Було підтверджено властивість скавенджера NO у сполуки С-3 в дослідях *in vitro* в суспензії нейронів в умовах моделювання нітрозуючого стресу. Внесення в суспензію нейронів разом з DNIC сполуки С-3 приводить до відновлення тіол-дисульфідної системи, а саме її глутатіонової ланки. Антиоксидантна дія С-3 відбувається на тлі підвищення концентрації HSP₇₀. Автор робить висновок, що сполука С-3 маючи властивості скавенджера NO перериває NO-залежні механізми нейродеструкції в умовах нітрозуючого стресу. С-3 опосередковано, через збереження рівня відновленого глутатіону може підтримувати концентрацію HSP₇₀ і впливати на реакції ендогенної нейропротекції. Референс-препаратом у даному дослідженні був обраний мексидол. За ступенем зниження показників оксидативного стресу сполука С-3 достовірно перевершувала мексидол.

Антиоксидантну і протиішемічну активність С-3 вивчали на моделі інфаркту міокарда. Препаратом порівняння був вибраний мілдронат. Курсове введення щурам з ІМ сполуки С-3 приводило до достовірного зниження ЧСС, зменшення відхилення ST, відновленню до контрольного рівня амплітуди зубця Т, що свідчило про кардіопротективну і протиішемічну дії цієї сполуки. Мілдронат мав менш виражений вплив на показники ЕКГ в умовах ІМ. Введення С-3 також приводило і до зниження маркерних продуктів оксидативного і нітрозуючого стресів – АФГ, КФГ і нітротирозину в гомогенаті міокарда. Зниження маркера нітрозуючого стресу – нітротирозину в міокарді щурів з ІМ підтверджує, що С-3 в силу особливостей своєї структури, є скавенджером NO. Мілдронат виявляв менш виражені антиоксидантні властивості в умовах інфаркту міокарда. Відомо, що моделювання ІМ призводило до порушення в нітроксергічній системі міокарда і дефіциту NO, який в умовах ішемії міокарда має роль ендотеліопротективного і кардіопротективного фактора, а саме: зниження експресії мРНК eNOS і підвищення експресії мРНК iNOS, зменшення активності та зниження загальної NOS. Введення тваринам з ІМ сполуки С-3 приводить до нормалізації експресії мРНК eNOS і мРНК iNOS та підвищення активності загальної NOS в міокарді. Мілдронат в умовах ІМ не впливає на експресію мРНК eNOS і приводить до подальшого підвищення експресії мРНК iNOS в міокарді експериментальних тварин. В умовах ішемії відбувається порушення енергозабезпечення міокарда. Сполука С-3 обмежувала активність малопродуктивного анаеробного гліколізу в умовах ішемії, про що свідчило зниження рівня лактату. При цьому сполука С-3 підвищувала окислення в циклі Кребса на дикарбоновій ділянці (підвищення

рівня малату) не впливала на трикарбонову ділянку циклу Кребса. Енерготропна дія С-3 доведена його впливом на компенсаторні цитозольно-мітохондріальні шунти енергії в міокарді в умовах ішемії. Введення С-3 приводить до збільшення транспорту енергії і її утилізації скорочувальними структурами міокарда. Мілдронат поступався сполуці С-3 по силі енерготропної дії. Враховуючи вищезазначене автор припускає, що домінуючим механізмом кардіопротективної і протиішемичної дії цієї сполуки є антиоксидантний. За рахунок своєї антиоксидантної дії С-3 зменшує АФК/NO-залежні механізми пошкодження мітохондрій і зберігає їх функціональну активність, що приводить до поліпшення енергетичного обміну міокарда в умовах ішемії.

Далі дисертантом були проведені дослідження антиоксидатної і протиішемичної активності сполуки С-3 на моделях робочої гіпоксії. Моделювання гострої робочої гіпоксії призводило до формування ішемії міокарда – дефіциту енергії АТФ, підвищення рівня лактату, зниження пірувату і малату, гіперферментемії МВ-КФК, підвищення продуктів окисної модифікації білка АФГ, КФГ і нітротирозину на тлі зниження активності -СОД. Профілактичне введення сполуки С-3 надавало значний антиоксидатний ефект, спрямований на пригнічення реакцій оксидативного стресу (зниження маркерів окисної модифікації білка – АФГ, КФГ і нітротирозину. Введення сполуки С-3 приводило до збільшення активності СОД в цитоплазмі міокарда. Введення сполуки С-3 надавало і протиішемичну дію, сприяючи більш «економному» витрачання енергетичних ресурсів міокарда при робочій гіпоксії. Енерготропна дія С-3, можливо, полягає в активації компенсаторних мітохондріально-цитозольних шунтів енергії і зменшення малопродуктивного анаеробного гліколізу. Позитивну дію цієї сполуки на енергетичний обмін автор пов'язує з його антиоксидатною дією і зниженням окислювального пошкодження мембран мітохондрій. Препаратом порівняння був обраний також мілдронат. Профілактичне введення мілдронату надавало менш виражений антиоксидатний ефект.

При фізичному навантаженні (гостра робоча гіпоксія) на тлі коронароспазму, попереднє введення сполуки С-3 тваринам надавало антиоксидантну дію, знижуючи утворення маркерів окисної модифікації білка в міокарді - АФГ, КФГ і нітротирозину, підвищення активності СОД в міокарді. Введення сполуки С-3 надавало і протиішемичну дію, покращуючи енергетичний обмін міокарда на піку фізичної втоми. В результаті реалізації антиоксидатної і протиішемичної дії С-3 в умовах більш жорсткої моделі робочої гіпоксії стало і підвищення толерантності до фізичних навантажень. Профілактичне введення С-3 приводило і до зниження гіперферментемії МВ-КФК після фізичного навантаження на тлі коронароспазму. С-3 також перевершувало мілдронат на моделі робочої гіпоксії за такими показниками як підвищення активності СОД, зниження нітротирозину, підвищення вмісту малату і зниження лактату. Сполука С-3 перевершувала мілдронат по збільшенню бігу на тредбані і зниженню гіперферментемії МВ-КФК. Введення сполуки С-3 приводило до появи актопротективної дії -

підвищувало толерантність до фізичних навантажень, нормалізувалася біоенергетика міокарда, зменшувались ішемічні зміни серця, а також гальмувались реакції оксидативного стресу. В якості домінуючого механізму дії С-3 дисертант розглядає антиоксидантну, спрямовану на зниження окислювальної модифікації білкових структур, можливо, і мембран мітохондрій і ключових ферментів енергетичного обміну. Профілактичне введення мілдронату надавало менш виражений антиоксидатний і протиішемічний ефекти. Отримані результати свідчать про наявність виражених антиоксидатних і протиішемічних властивостей сполуки С-3.

Антиоксидантні і протиішемічні властивості сполуки С-3 були додатково дослідженні на моделі внутрішньомозкового крововиливу (ВК). Моделювання ВК викликало типові неврологічні порушення порівнянні з клінікою геморагічного інсульту з максимальними проявами на 4 добу. Показники виживання тварин оцінювали на 4-у і 18 –у добу. В контрольній групі на 4- у і 18 –у добу вижило 55 та 50 % тварин відповідно. Введення щурам з ВК сполуки С-3 приводило до 100% виживання тварин на 4-у та 18-у добу після ВК. Введення пірацетаму тваринам з ВК не здійснювало достовірного впливу на показник виживання. Сполука С-3 за впливом на виживання конкурує з мексидолом.

Також на 4-добу після ВК змінюється характер експресії мРНК NOS в СА1-зоні гіпокампу тварин – відбувається збільшення експресії мРНК нейрональної синтази оксиду азоту та значне підвищення експресії мРНК індукцибельної NO-синтази. Курсове призначення С-3 тваринам з ВК приводило до достовірного зниження в СА1-зоні гіпокампа експресії мРНК nNOS стосовно значень контролю і підвищенню експресії мРНК nNOS стосовно значень хибнооперованих тварин. Як прояв нейропротективного ефекту сполуки С-3 може розцінюватися зменшення експресії нейрональної і індукцибельної синтази оксиду азоту. Введення мексидолу тваринам з ВК також знижувало експресію мРНК nNOS відносно контрольної групи і підвищувало щодо хибнооперованих тварин.

Моделювання ВК у щурів призводило до зміщення тіол-дисульфідної системи у вигляді зменшення пулу її відновлених форм і підвищення окислених на тлі пригнічення активності глутатіон-залежних ферментів. Були отримані наступні результати впливу С-3 і референс-препаратів на тіол-дисульфідну рівновагу. Так відзначалося зростання значень інтермедіатів тіол-дисульфідної системи - підвищення активності ГР, ГПР і Г-S-T. Мексидол та пірацетам за ступенем впливу на активність глутатіон-залежних ферментів достовірно поступався сполуці С-3. Застосування С-3 також приводило і до зниження вмісту в тканинах мозку потенційних нейротоксичних речовин, таких як гомоцистеїн. Крім того, С-3 сприяло підвищенню біодоступності NO, а також зменшувало його нейротоксичність, що проявлялось у вигляді значного зниження рівня нітротирозину. Відомо, що таким чином скавенджери NO переривають NO-залежні механізми нейродеструкції і виявляють нейропротективний ефект.

Автором було виявлено зниження рівня білка теплового шоку HSP₇₀ в головному мозку експериментальних тварин з ВК. Введення С-3 сприяло нормалізації рівня цього показника, що свідчить про здатність досліджуваної сполуки впливати на механізми ендогенної нейропротекції.

З метою отримання інтеграційних уявлень про відновлення ЦНС на 28-у добу після ВК було вивчено вплив С-3 на навчання і пам'ять експериментальних тварин. Відомо, що наслідком ВК є порушення когнітивно-мнестичних функцій у тварин, що проявляється у збільшенні кількості помилок робочої пам'яті та кількості помилок референтної пам'яті. Введення С-3 приводило до достовірного підвищення загальної рухової активності і зниження помилок референтної і робочої пам'яті, що підтверджувало позитивну дію даної сполуки на когнітивно-мнестичні функції ЦНС після ВК. За ступенем впливу на експресію мРНК iNOS, мРНК nNOS, концентрацію iNOS, активність NOS, вміст GSH, активність GSH-залежних ферментів, вміст HSP₇₀ в головному мозку щурів на 4-у добу після ВК, а також показники робочої пам'яті на 29-у добу після ВК С-3 достовірно перевершує як пірацетам, так і мексидол.

Механізм антиоксидантної, протиішемічної, кардіопротективної і нейропротективної дії С-3 може бути пояснений наявністю в його структурі гідразину, який обумовлює наявність властивостей скавенджера NO у молекули С-3. Розрахунками показано, що С-3 може проявляти властивості спінової пастки.

6-й розділ присвячений аналізу та узагальненню результатів дослідження, свідчить про глибокі знання дисертанта наукової літератури, про здатність аналітично оцінювати власні результати та співставляти їх з даними інших науковців. В цьому розділі автор акцентував на тому, що для пошуку фармакологічно активних речовин використовуються різні підходи, наприклад, біо- і нейрохімічні, біофізичні, класичний QSAR, математичне моделювання оксидативного і нітрозативного стресу. Дійсно розробка та впровадження інформаційних технологій прогнозу антиоксидантної активності по інгібуванню NO активності хімічних сполук і комп'ютерного пошуку нових лікарських речовин є перспективним пріоритетним напрямком сучасної науки і має високий ступінь актуальності. Було виділено декілька етапів в створенні препаратів антиоксидантної дії. Ще раз були зазначені алгоритми розробленої математико-теоретичної основи комплексного підходу до створення комп'ютерної програми віртуального скринінгу скавенджерів NO в ряду ксантину. Побудований алгоритм та розроблена комп'ютерна програма віртуального скринінгу АОА по інгібуванню NO та встановлена залежність АОА речовин від їх квантово-хімічного показника і визначена функція їх залежності за ступенем розсіювання його значень навколо лінії регресії. Був запропонований алгоритм програми віртуального скринінгу. Програма комп'ютерного прогнозу і віртуального скринінга дозволяє уникнути багаторівневого витратного етапу створення лікарських засобів – органічного синтезу. При оптимізації досліджуваних моделей найкращу узагальнюючу здатність показала модель "градієнтного бустінга".

На основі алгоритму була створена комп'ютерна програма віртуального скринінгу у вигляді веб-додатку. В результаті застосування цієї програми дисертантом було виявлено сполуку С-3, що проявляє в умовах експерименту на тваринах високу антиоксидантну, протиішемичну, кардіопротективну і нейропротективну активність.

Список літературних джерел оформлено згідно відповідних вимог до бібліографічних даних, посилання за текстом дисертації відповідають за змістом та суттю вказаній науковій праці.

Наукова новизна отриманих результатів. Ступінь новизни роботи високий, оскільки мова йде про експериментальне вирішення актуальної задачі сучасної фармакології, спрямованої на оптимізацію цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину.

В дисертаційній роботі вперше створена комп'ютерна програма віртуального скринінгу за допомогою алгоритмів машинного навчання з використанням моделі "градієнтного бустінга" для оптимізації цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду знову синтезованих сполук.

Вперше за допомогою нової комп'ютерної програми для прогнозу антиоксидантної активності серед додатково синтезованих похідних ксантину була виявлена сполука – гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3) з властивостями скавенджера NO, яка в дослідях *in vitro* гальмує реакції нітрозуючого стресу.

Встановлено, що С-3 підвищує активність глутатіонової системи та концентрацію HSP₇₀ у суспензії нейронів при моделюванні нітрозативного стресу *in vitro*.

Вперше показано, що С-3 в умовах експериментального інфаркту міокарда, гострої робочої гіпоксії та ВК має антиоксидантну і протиішемичну дію за силою якої перевершує референс-препарати (мілдронат, мексидол і пірацетам). Вперше на моделі інфаркту міокарда і ВК показано, що С-3 гальмує експресію мРНК iNOS і iNOS в головному мозку і міокарді, а на моделі ВК підвищує концентрацію HSP₇₀ (в гострий період) в головному мозку експериментальних тварин і покращує показник робочої та референтної пам'яті у експериментальних тварин (в відновний період). Вперше показано, що С-3 підвищувала толерантність до фізичних навантажень на тлі покращення біоенергетики міокарду та гальмування оксидативного стресу.

Практичне значення отриманих результатів. Практична значення роботи визначається тим, що вперше розроблено і створено програму віртуального скринінгу речовин з потенційною антиоксидантною активністю по інгібуванню NO у вигляді веб-додатка. Створена програма віртуального скринінгу скавенджерів NO може бути використана для спрямованого пошуку нових високоактивних антиоксидантів серед нових синтезованих сполук, а також для планування синтезу нових речовин з антиоксидантною активністю шляхом прогнозу рівня заданого виду активності. Встановлений та експериментально доведений механізм дії похідного ксантину – С-3, це

може сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських засобів, які переривають NO-залежні ланки ішемічного пошкодження міокарда та головного мозку.

Апробація результатів дисертації. Основні результати викладені та обговорені на чисельних науково-практичних конференціях молодих вчених та студентів, та науково-практичних конференціях з міжнародною участю та ін. Загалом матеріали дисертації повідомлено та обговорено на 12 конференціях, за результатами яких надруковані тези.

Висновки зроблені Риженком В.П., чіткі, коректні, базуються на фактичному експериментальному матеріалі, статистично підтверджені, містять репрезентативні дані, фактично відповідають завданням дослідження.

В якісному і кількісному (7) характері і обсязі вони повністю відповідають матеріалу викладеному в дисертації та авторефераті та опублікованому у фахових виданнях.

Наведені висновки характеризують основні досягнення, які здобуті та викладені в дисертації.

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту та оформлення. Дисертаційна робота виконана на високому сучасному рівні, дає привід для наукової дискусії. Назва дисертації повністю відповідає змісту. Висновки аргументовані і базуються на великій кількості експериментальних даних. Незважаючи на новизну, практичну значимість, достатній методичний рівень, об'єм досліджень, при роботі з дисертацією виникли зауваження, побажання і запитання, на які хотілося б отримати відповідь дисертанта. Позитивно характеризуючи дисертацію в цілому, слід звернути увагу на деякі недоліки.

Рукопис дисертації та автореферат, на жаль, як і будь-яка інша робота, не позбавлені недоліків оформлення, зокрема наявності не зовсім чітких та вдалих речень (с. 86, 124, 143, 149 та ін.), стилістичних (с. 124, 149, 159 та ін.) і орфографічних помилок, які утруднюють сприйняття матеріалу, але не нівелюють наукову цінність та практичне значення отриманих Риженком В.П. результатів, не спростовують їх, не впливають на висновки, зроблені дисертантом.

Крім того, хотілося б почути точку зору дисертанта на питання, що виникли у процесі роботи з дисертацією:

1. Ви створили ефективну програму віртуального скринінгу скавенджерів NO на основі математичної моделі навчання. Ваша програма при прогнозі відсутності встановлюваних властивостей у тестованій сполуки показує значення близьке до нуля. Чи можна очікувати отримання від'ємного значення при застосуванні цієї програми і як його можна інтерпретувати?

2. Сполука С-3 продемонструвала достовірну актопротективну дію, підвищуючи працездатність тварин при різних режимах навантаження. Як цей фармакологічний ефект С-3 може бути пояснений через його властивості спінової пастки NO?

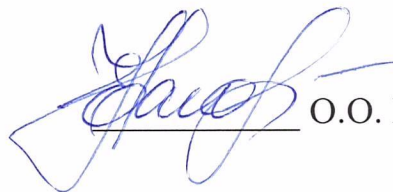
3. З огляду на загальнобіологічну роль NO, його участь в регуляції функцій ЦНС, серцево-судинної системи, шляхів метаболізму, чи можете Ви дати прогноз про можливі побічні реакції скавенджерів NO?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертаційна робота Риженка Віктора Павловича «Оптимізація цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину» являє собою закінчену наукову роботу, що виконана на хорошому методичному рівні із застосуванням сучасних методів на достатній кількості тварин.

Робота має наукову новизну, тому що створена комп'ютерна програма віртуального скринінгу за допомогою алгоритмів машинного навчання з використанням моделі "градієнтного бустінга" для оптимізації цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду знову синтезованих сполук. За допомогою нової комп'ютерної програми виявлена сполука – (С-3) з властивостями скавенджера NO. Вперше показано, що С-3 в умовах експериментального інфаркту міокарда, гострої робочої гіпоксії та ВК має антиоксидантну і протиішемічну дію за силою якої перевершує референс-препарати. Робота має практичне значення, тому що доведено, що С-3 в умовах експериментального інфаркту міокарда, гострої робочої гіпоксії та ВК має антиоксидантну і протиішемічну дію за силою якої перевершує референс-препарати.

Таким чином, за актуальністю проблеми, високим методичним рівнем, обсягом досліджень, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів, їх вірогідністю, обґрунтованістю висновків, ступенем опублікування та загальним науковим рівнем дисертаційна робота Риженка Віктора Павловича «Оптимізація цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину», що представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія, є самостійним, завершеним науковим експериментальним дослідженням і повністю відповідає вимогам п. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 (зі змінами), а її автор Риженко Віктор Павлович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Медичний директор
ТДВ «ІнтерХім»,
доктор медичних наук

 О.О. Нагорна