

ВІДГУК

офіційного опонента доктора медичних наук, професора Супрун Еліни Владиславівни на дисертаційну роботу РИЖЕНКА Віктора Павловича «Оптимізація цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину», подану в спеціалізовану вчену раду Д.26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Дисертаційна робота Риженко Віктора Павловича присвячена актуальній проблемі сучасної медицини – пошуку нових ефективних антиоксидантів, шляхом розробки комп'ютерної програми для селективного віртуального скринінгу скавенджерів NO серед знову синтезованих похідних ксантину.

Актуальність теми. В останні десятиріччя спеціалістами більшості економічно-розвинених країн реєструється постійне зростання розповсюдженості цереброваскулярних та інших захворювань, вагомою ланкою патогенезу яких є гіперпродукція активних форм кисню. Дослідженнями останніх десятиріч встановлено, що однією з ланок патогенезу нейродеструкції головного мозку є гіперпродукція активних форм кисню (супероксидрадикал, гідроксил-радикал, пероксинітрит-аніон, гіпохлорид-аніон тощо) біоенергетичними і нейрохімічними системами клітини, що призводить до окислювальної модифікації і деструкції білків, ліпідів і нуклеїнових кислот. Первинні засоби корекції нейродеструкції головного мозку (антиоксиданти та енерготропи) використовують без достатніх знань про їх можливість та особливості дії, без спеціально розроблених підходів до їх використання, без планування стратегії лікування з позиції доцільності.

Велика кількість етіологічних та патогенетичних факторів ішемічних уражень мозку диктує необхідність подальших досліджень механізмів розвитку церебральної ішемії, а також розробки методів її ефективної фармакологічної корекції. Серед перспективних мішеней нейропротективної терапії звертає на себе увагу сімейство білків теплового шоку HSP70 та фактору, що індукується гіпоксією Hif-1 α , який забезпечує довготривалу адаптацію клітин до умов гіпоксії.

Сучасні засоби корекції вільно-радикального ушкодження тканин використовують без достатніх знань про їх можливість та особливості дії, без спеціально розроблених підходів до їх використання, без планування стратегії лікування з позиції доцільності. Тому встановлення закономірностей зв'язку між хімічною структурою сполук та їх специфічною активністю у відношенні активних форм кисню та азоту, є актуальним завданням в процесі пошуку і створення ефективних антиоксидантів.

У процесі дисертаційного дослідження здобувачем була проведена оцінка антиоксидантної активності похідних ксантину та обробка

отриманих результатів статистичними методами з проведенням квантово-механічних розрахунків цих похідних, що визначають антиоксидантну активність щодо супероксидрадикалу, пероксинітрита і монооксиду азоту. Були вибрані розрахункові базові структури як основи для комп'ютерної програми прогнозу потенційно перспективних сполук з властивостями скаведжерів активних форм кисню та азоту та проведена оцінка достовірності прогнозу при тестуванні на структурах навчання і на екзаменаційній серії сполук. Це дозволило запропонувати алгоритм комп'ютерної програми віртуального скрінінгу пасток NO в ряду азагетероциклів

Отже, вибрана дисертантом тема конкретного дисертаційного дослідження без усяких сумнівів є високоактуальною і важливою з огляду на теоретичне та практичне значення результатів.

Ступінь обґрунтованості положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану 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 вищезазначеної теми.

Результати досліджень, представлених в дисертації, обґрунтовані об'ємним і достовірним матеріалом. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів фармакологічних, біохімічних, гістоімунохімічних, імуноферментних, морфологічних досліджень та віртуального скрінінгу, що базуються на адекватних методах та достатній статистичній і математичній обробці отриманого цифрового матеріалу, що відповідає міжнародним стандартам. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає сформульованим цілі та задачам дослідження, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

Загальні відомості про роботу. Дисертаційна робота викладена на 266 сторінці машинописного тексту, містить анотації українською та англійською мовами, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення результатів, а також висновків та списку використаних літературних джерел. Дисертація ілюстрована 26 таблицями та 25 рисунками. Список використаних джерел налічує 287 найменувань (193 – латиницею).

За темою дисертації опубліковано 20 наукових робіт, у тому числі 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.

Огляд літератури висвітлює сучасні аспекти віртуального скринінгу біологічно активних речовин в ряду знову синтезованих сполук за допомогою комп'ютерних програм та молекулярно-біохімічні механізми розвитку постішемичної деструкції та шляхи пошуку корекції порушень ендогенної нейропротекції при гострій ішемії головного мозку і складається з трьох підрозділів: «Сучасні погляди на роль нітрозуючого стресу в патогенезі захворювань людини. Уявлення про антиоксиданти. Характеристика скавенджерів монооксиду азоту», «Сучасні підходи комп'ютерного забезпечення для віртуального скринінгу» та «Сучасні підходи комп'ютерного забезпечення для віртуального скринінгу». Проаналізовано всі етапи ішемического каскаду розвиваються в перші хвилини і години інсульту або будь-якого ішемічно-гіпоксичного ураження речовини мозку і, взаємопотенціюючи дії один одного, призводять до важких функціонально-морфологічних пошкоджень структур головного мозку.

Одну з головних ролей в ініціації і розвитку оксидативного стресу відіграє перший етап – початковий (індукція), тому що він безпосередньо пов'язаний з продукцією АФК і азоту, біоенергетичними і нейрохімічними реакціями і може модулюватися фармакологічними засобами неантиоксидатної групи. Механізми утворення АФК можуть бути різними – як ферментативні (ксантинооксидазна, iNOS, НАД-оксидоредуктазна та інше), так і неферментативні (метаболізм катехоламінів, арахідонової кислоти і т.д.). Найбільша роль в продукції АФК при ішемії належить мітохондріям. Останнім часом з'явилися роботи про значний внесок мітохондрій в утворення АФК і ініціацію оксидативного стресу. Численні дослідження продемонстрували пряму участь NO в процесі деструкції нейрона при ішемії при застосуванні у тварин з гострим порушенням мозкового кровообігу (ГПМК). Численними роботами показано участь NO в ініціації оксидативного стресу, нейроапоптоза і загибелі нейронів при церебральній ішемії. Відомо, що активність та експресія iNOS і nNOS в мозку тварин з церебральною ішемією збільшується з перших хвилин ішемії, досягаючи максимуму на 4-у добу. Цитотоксичні продукти NO взаємодіють з залізом гемоглобіну, міоглобіну, активних центрів ферментів, Fe/SH-комплексів ДНК. Більш ретельне вивчення антиоксидатної системи, особливо інтермедіатів тіол-дисульфідної системи, дозволяє виділити в окрему систему глутатіонпероксидазу (ГПР) і глутатіон-S-трансферазу (GST). Дані ферменти беруть участь у біотрансформації ксенобіотиків, підтримці тіолового статусу клітини, утилізують перекиси і гідроперекиси ліпідів, контролюють синтез простагладінів. Недостатньо активна антиоксидатна

система клітини або якась її частина призводять в умовах ішемії до гіперпродукції АФК.

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. Перспективними представляються антиоксиданти, що діють на ініціальних етапах оксидативного стресу - інгібітори шляхів утворення АФК та скавенджери АФК, а з урахуванням ролі нітроксидергічної системи в патогенезі ряду захворювань, то скавенджери NO. В цьому напрямку перспективними є похідні ксантину, у яких описані антиоксидантні властивості в роботах дослідників із Запорізького державного медичного університету, Інституту фармакології та токсикології АМН України, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Національного фармацевтичного університету, а також рядом наукових центрів країн пострадянського простору, Японії, Індії, Китаю та Євросоюзу.

Вищевикладене обумовлює необхідність створення нових високоефективних і малотоксичних препаратів нейропротективної дії. У створенні нових антиоксидантних засобів основну роль грають фундаментальні дослідження в області нейрохімії, цитоімунології, молекулярної біології, фізичної та теоретичної хімії, генетики, квантової фізики, програмування.

Дослідження закономірностей взаємозв'язку між хімічною структурою з'єднань і їх біологічною активністю (СА) є одним з найбільш важливих напрямків пошуку і розробки лікарських засобів. З метою скорочення і спрощення розрахунків, а також виключення принципових помилок, необхідно в міру можливості враховувати механізм дії даного ряду сполук в прояві певного виду біологічної активності.

Подання хімічної структури у вигляді електронно-топологічної матриці суміжності (ЕТМС), засноване на конформаційних і квантово-хімічних розрахунках, дозволяє отримати повну інформацію про розподіл електронної щільності в молекулі сполуки і уніфіковано описати будову різних з'єднань електронною мовою. З метою подолання цих труднощів був розроблений композиційний метод розрахунку електронної будови багатоатомних систем, суть якого зводиться до розчленування великої молекулярної системи на невеликі фрагменти, проведення розрахунку для кожного з них окремо, а потім до стикування їх за певними правилами в єдину молекулу. Подальше вдосконалення композиційного методу в поєднанні з програмними комплексами по дослідженню СА дозволить на якісно новому рівні вирішувати проблеми конструювання нових біологічно активних сполук.

Серед численних розрахункових методів, описаних вище, в даний час особлива увага приділяється електронно-топологічному підходу, що враховує електронну будову досліджуваних сполук і дозволяє проводити пошук молекулярних фрагментів – ознак активності – для вирішення завдань з конструювання біологічно активних сполук.

Створення нових високоефективних і більш безпечних лікарських засобів засновано на використанні існуючих в даний час матеріальних та інформаційних ресурсів. До теперішнього часу для оцінки профілів (спектрів) біологічної активності, що характеризують загальний вплив органічних з'єднань на біологічні об'єкти, значно частіше використовують методи, засновані на структурі лігандів. У всіх сучасних дослідженнях, спрямованих на комп'ютерний аналіз залежностей «структура-активність», необхідно попередньо «нормалізувати структуру» (прибрати сольовий компонент, нейтралізувати заряди, замінити координаційні зв'язки простими і т.д.).

Але, не зважаючи на досягнуті успіхи в області конструювання, розробки і створення високоефективних антиоксидантів проблема залишається актуальною. Це пов'язано перш за все з тим, що програми віртуального скринінгу, які широко застосовуються (PASS, Orakul и ін.), не дають чітких значень прогнозу механізму антиоксидатної дії, тобто не прогнозують властивостей скавенджера супероксидрадикала, гідроксидрадикала або NO, а прогнозують тільки наявність/відсутність антиоксидантної активності. Все це вимагає нагальної необхідності до розробки більш селективної програми комп'ютерного прогнозу антиоксидатної активності. З урахуванням ролі нітрозуючого стресу в NO-залежних реакціях пошкодження клітини, потрібна програма прогнозу властивостей скавенджера NO.

Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень» представлений характеристиками об'єктів та предметів дослідження, характеристиками лабораторних тварин та переліку використаних засобів та методів дослідження. Для дослідження АОА *in vitro* було відібрано 122 сполуки похідних ксантину, синтезованих на кафедрі біологічної хімії Запорізького державного медичного університету. АОА сполук при інгібуванні NO *in vitro* тестували за ступенем гальмування окиснення аскорбінової кислоти при 265 нм. Індукцію NO проводили опроміненням водних розчинів нітрит нітропрусида (10 мМ) і аскорбінової кислоти (40 мМ) перед джерелом світла (300 Вт) з довжиною хвилі 425 нм. В якості референс-препарата при дослідженні АОА *in vitro* був обраний N-ацетилцистеїн (10^{-3} - 10^{-7} М) (Sandoz, Німеччина), що виявляє властивості скавенджера NO. Для моделювання нітрозуючого стресу використовували динітрозольний комплекс заліза (II)-цистеїна (DNIC). Всі досліджувані речовини та референс-препарати вводили в інкубаційну систему в концентраціях, відповідних їх молекулярним масам. Експериментальна частина виконана на 261 білому безпородному щурі (самки та самці), масою 140-160 г отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Дисертант в своїх експериментах використав дуже широкий набір експериментальних підходів для вирішення поставленої мети, яку він сформулював наступним чином: «На підставі розробленого комплексного підходу (комп'ютерний прогноз, скринінг *in vitro* та *in vivo*) виявити серед похідних ксантину найбільш активну сполуку з властивостями скавенджера

NO, оцінити її протиішемні, антиоксидантні властивості та особливості дії в умовах ішемії міокарда та головного мозку».

Всі експерименти проведені на базі Навчального медико - лабораторного центру ЗДМУ, атестованому МОЗ України (атестат №039/14). Внутрішньомозковий крововилив (ВК) моделювали шляхом введення 0,1 мл аутокрові, узятої із хвостової вени, на 100 гр. ваги тварини в область внутрішньої капсули і стріопалідарних ядер головного мозку тварини з використанням стереотаксичної техніки. Досліджувані препарати вводили за допомогою металевго зонда протягом 4 та 18 діб один раз на добу – С-3 (100 мг/кг), мексидол (200 мг/кг) (ЗАО «ЗиО-Здоровье», Російська Федерація), пірацетам (500 мг/кг) (Шрея Лайф Саенсиз Пвт. Лтд., Індія)

Інфаркт міокарда (ІМ) моделювали за схемою: пітуїтрин (АВ "Endokrininiai", Літва) – 0,5 Ед/кг – в/о, через 20 хв. ізадрин (ВАТ"Нижфарм", Російська Федерація) – 100мг/кг – п/ш. Після 6 годин вводиться ізадрин в тій самій дозі. Через добу вводився в тих же дозах обидва агенти. Досліджувані препарати вводили 3-х кратно протягом доби паралельно з формуванням інфаркту внутрішньшлунково С-3 (100 мг/кг), мілдронат – 250 мг/кг (АО Гриндекс, Латвія). Гостру робочу гіпоксію моделювали при фізичному навантаженні на третбані – тварин змушували бігти на третбані до повного виснаження. Також гостру робочу гіпоксію моделювали на тлі попереднього (за 30 хв.) введення пітуїтрину (1 Од/кг). Сполуку С-3 вводили внутрішньшлунково в дозі 100 мг/кг за 30 хв. до експерименту, референс-препарат мілдронат – 250 мг/кг. Аналіз ЕКГ проводився на аналізаторі CardioCom-2000plus під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг).

Тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Для біохімічних досліджень головний мозок подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану та гомогенізували відповідно встановлених рекомендацій. Цитоплазматичну і мітохондріальну фракції виділяли методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифугі «Sigma 3-30k» при 14000 g 10 хв (при +4°C). Інтенсивність оксидативного стресу оцінювали за вмістом маркерів окисної модифікації білка – альдегідфенілгідразонів (АФГ) і карбоксифенілгідразонів (КФГ) за реакцією взаємодії окиснених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідрaziном (2,4-ДНФГ). Стан тіол-дисульфідної системи головного мозку оцінювали за вмістом відновленого глутатіону (GSH) та окисненого глутатіону (GSSG) флуориметрично з о-фталевим ангідридом на флуориметрі. Рівень вільних SH-груп (по реакції з 5,5-дітіо-біс-7-нітробензойною кислотою), активність глутатіонредуктази (ГР) (НАДФН- залежна реакція відновлення GSH), глутатіонпероксидази (ГПР) (по реакції з гідроперекису трет-бутилу) та глутатіонтрансферази (GST) вимірювали спектрофотометрично – на спектрофотометрі Libra S 32 PC. Енергетичний обмін міокарда та головного мозку визначали за вмістом АТФ, АДФ, АМФ, стан гліколізу оцінювали за рівнем лактату і пірувату; окислення в циклі Кребса визначали за вмістом малату та активності мітохондріальної НАДН-малатдегідрогенази (МДГ).

Стан нітросидергічної системи оцінювали за активністю NO-синтази

(NOS), вмістом нітратів, концентрацією мРНК iNOS і мРНК eNOS. Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту визначали за реакцією з реактивом Грісса. Активність NOS визначали спектрофотометрично при 340 нм методом, в основі якого знаходиться стехіометричне окиснення НАДФН в процесі реакції утворення NO із L-аргініну. Для оцінки стану експресії мРНК iNOS і мРНК eNOS використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР), ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems, США). Вміст HSP₇₀ білку визначали методом вестерн-блот аналізу. Активність МВ-КФК в сироватці крові та активність КФК-мт і КФК-цт визначали на біохімічному аналізаторі Prestige 24i. Концентрацію аргініну, аспартату, метіоніну, цистеїну визначали методом тонкошарової хроматографії. Концентрацію білка оцінювали за методом Бредфорда. Нітротирозин визначали твердофазним імуносорбентним сендвіч-методом ELISA. Дослідження референтної і робочої пам'яті у тварин з ВК проводили за допомогою радіального лабіринту LE760. Захоплення і запис зображення проводився за допомогою кольорової відеокамери SSC-DC378P. Проведено квантово-хімічні розрахунки дескрипторів HOMOEnergy (вища зайнята молекулярна орбіталь) і LUMOEnergy (нижча вакантна молекулярна орбіталь) за допомогою програмного комплексу WinMopac (v. 7.2). Оптимізація структури досягалася використанням напівемпіричного методу AM1 (RHF).

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилася перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Shapiro-Wilk та Колмогорова-Смірнова). За умов нормального розподілу встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного U-критерію Мана-Уїтні. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць спряженості. Для порівняння незалежних змінних у більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі, або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності $p < 0,05$ (95%). Програму віртуального скринінгу реалізовано у вигляді веб-додатку мовою програмування Python, яка може використовуватися для створення комбінаторних бібліотек, опису когнітивних мереж, моделювання реакцій окислативного стресу, роботи нітроксидергічної системи і активації нітрозуючого стресу.

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

Розділ 3 присвячений математико-теоретичному обґрунтуванню створення програми віртуального скрінінга. В роботі наведено теоретичне обґрунтування, графічні підходи до програмного забезпечення віртуального скрінінга та розробка математичного підходу до створення комп'ютерної програми віртуального скрінінгу.

Для оптимізації пошуку скавенджерів NO серед похідних ксантину було розроблено та реалізовано електронно-топологічний підхід, що включає наступні етапи роботи: розрахунок квантово-хімічних характеристик молекул за допомогою програмного комплексу WinMOPAC (з використанням конформаційного аналізу); дослідження АОА *in vitro* по інгібуванню NO 122 похідних ксантину; розрахунок залежності між параметрами квантово-хімічних сполук і АОА; створення робочих баз даних показників АОА і квантово-хімічних параметрів сполук; створення програми віртуального скрінінгу на основі алгоритму, що враховує залежність квантово-хімічних сполук та їх АОА; тестування комп'ютерної програми на знову синтезованих сполуках

4-й розділ присвячений результатам власних досліджень. Оцінка антиоксидантної активності (АОА) по інгібуванню NO • -радикала *in vitro* серед 122 похідних ксантину було встановлено, що в діапазоні концентрації 10^{-7} М- 10^{-3} М – 46-121 сполука відповідно проявляють властивості скавенджерів NO, із них по силі дії перевершують НАС 46-117 сполук відповідно. Проведення квантово-хімічних розрахунків похідних ксантина та визначення АОА досліджуваних сполук на моделі інгібування NO дозволило встановити залежність біологічної дії речовин від їх квантово-хімічних дескрипторів та визначена функція їх залежності. Була знайдена залежність між значеннями однієї випадкової величини і відповідними їй середніми значеннями іншої випадкової величини.

Встановлення залежності антиоксидантної активності від квантово-хімічних дескрипторів похідних ксантину було проаналізовано за допомогою алгоритмів машинного навчання з використанням наступних моделей: Linear Regression, Support Vector Machine Regression, Random Forest Regression, Gradient Boosting Regression, K-Nearest Neighbors Regression. Були перевірені кілька моделей для вирішення задач регресії. Кращими моделями без застосування оптимізації виявилися моделі "опорних векторів" і "к-найближчих сусідів". При оптимізації досліджуваних моделей найкращу узагальнюючу здатність показала модель "градієнтного бустінга" з помилкою в межах 16%.

З метою розробки алгоритму комп'ютерної програми для віртуального скрінінгу NO в ряду азагетероциклів встановлено, що поліпшення якості обраної моделі можливо за рахунок збільшення навчальної та тестової вибірок, а також розширення ознак для поглиблення моделі та поліпшення узагальнюючої здатності. Отже, автором було розроблено і створено програму віртуального скрінінгу речовин з потенційною АОА по інгібуванню NO та проведено аналіз залежності антиоксидантної активності

від квантово-хімічних показників похідних ксантину за допомогою алгоритмів машинного навчання

Розділ 5 відведений визначенню валідності комп'ютерної програми віртуального скринінгу АОА. Автором було визнано за доцільне випробувати дану програму на знову синтезованих сполуках, а саме їх тестування і дослідження фармакологічної активності. Оцінка валідності програми віртуального скринінгу проведена на підставі виявленої автором закономірності залежності між квантово-хімічними параметрами вивчених сполук та їх АОА по інгібуванню NO. В процесі тестування 7 нових синтезованих похідних ксантину комп'ютерна програма надала можливість прогнозу найбільш виражених властивостей скавенджера NO у гідразид 8-бензиламініотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3). Дослідами *in vitro* прогноз властивостей скавенджера NO у С-3 був підтверджений (267,3%). Таким чином, базуючись на даних попередніх досліджень і результатів програми віртуального скринінгу та для її більш поглибленого випробування було прийняте рішення вивчення антиоксидантної дії С-3 в дослідях *in vitro* в суспензії нейронів та *in vivo* на моделях ішемії головного мозку і міокарду.

Антиоксидатна і нейропротективна активність сполуки С-3 визначена в дослідях *in vitro* в суспензії нейронів та *in vivo* на моделях ішемії головного мозку і міокарду. Було встановлено, що внесення нейротоксичних доз DNIC у суспензію нейронів призводило до розвитку нітрозуючого стресу (підвищення рівня нітротирозину на 230%) на тлі пригнічення глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи, зниження концентрації ендogenous цитопротектора HSP₇₀ на 51%. Внесення в інкубаційну суміш С-3 (10⁻⁵ М) призводить до зниження нітротирозину на 45% і окисненого глутатіону на 53,2% на тлі збільшення концентрації GSH на 43,8% і підвищення активності GSH-залежних ферментів – ГПР на 337% і ГР на 195%, підвищення концентрації HSP₇₀ на 34,7%. Доведено, що за силою дії С-3 достовірно перевершує мексидол (10⁻⁵ М). Отримані результати експериментально підтвердили прогноз програми віртуального скринінгу щодо наявності у сполуки С-3 властивостей скавенджера NO.

Аналіз антиоксидантної і протиішемічної активності С-3 на моделі інфаркту міокарда підтвердив, що курсове введення щуром з ІМ сполуки С-3 (100 мг/кг) приводило к поліпшенню електрофізіологічних показників серця, що свідчило про протиішемічну дію С-3 – зниження ЧСС на 22,3% та зменшення відхилення ST на 78,4%, підвищенні активності СОД на 140% і ГПР на 118,7% в цитозолі міокарда, зниження маркерних продуктів оксидативного і нітрозуючого стресів – АФГ на 61%, КФГ на 48,3% і нітротирозину на 40,9%, нормалізації експресії мРНК eNOS і мРНК iNOS. Відзначено найбільш виражену позитивну дію С-3 на активність СОД – ферменту, що нейтралізує супероксидрадикал і регулює багато АФК-залежних механізмів регуляції метаболізму, пригнічує запалення та апоптоз.

Призначення тваринам з ІМ сполуки С-3 призводило до посилення продукції АТФ на 52%, підвищення активності МДГ в ішемізованому міокарді на 109%, збільшення вмісту малату на 112,3% і глутамату на 33,3%,

підвищення активності КФК-мх на 76,7% і КФК-цт на 40,2%, що свідчить про збільшення транспорту енергії та її утилізації скорочувальними структурами міокарда.

Автором зроблено припущення про наявність прямої протективної дії С-3 на NOS від окисної модифікації за рахунок властивостей спінової пастки NO. Введення сполуки С-3 тваринам з експериментальним ІМ надавало значний антиоксидантний ефект, який має важливу роль в реалізації загальної кардіопротективної дії, оскільки збільшення продукції АФК та продуктів окисної модифікації білка може мати вирішальне значення в активації апоптозу.

Дослідження антиоксидатної і протиішемичної активності сполуки С-3 на моделях робочої гіпоксії продемонструвало, що у експериментальних тварин відзначено формування ішемії міокарда – дефіциту енергії, підвищення рівня лактату, дискоординації в циклі Кребса, активації оксидативного і нітрозуючого стресів, а також зниження толерантності до фізичного навантаження, що виражалось в зменшенні тривалості бігу. Профілактичне введення сполуки С-3 (100 мг/кг) надавало значний антиоксидантний ефект, спрямований на пригнічення реакцій оксидативного стресу – зниження маркерів окисної модифікації білка – АФГ на 40,4%, КФГ – на 45,8% і нітротирозину на 35,2%, збільшення активності СОД в цитоплазмі міокарда на 56,0%. Введення сполуки С-3 надавало і протиішемичну дію, сприяючи більш «економному» витрачання енергетичних ресурсів міокарда при робочій гіпоксії – збільшення вмісту АТФ в міокарді на 34,1% вмісту малату на 53,3% і пірувату на 17,5% та зменшення вміст лактату на 43,4% в міокарді, збільшення тривалості бігу на третбані на 177,9%.

Автор зробив висновок, що в умовах відтворення моделі робочої гіпоксії домінуючим механізмом дії С-3 є антиоксидантний. За силою антиоксидантної, актопротективної та протиішемичної дії С-3 перевершує мілдронат.

Дослідження антиоксидатних і протиішемичних властивостей сполуки С-3 на моделі внутрішньомозкового крововиливу (ВК) виявило порушення нітроксидергічної системи і ініціюванню нітрозуючого стресу в мозку експериментальних тварин. Призначення сполуки С-3 тваринам з ВК призводило до зниження в мітохондріях головного мозку активності NOS на 51%, нітритів на 38,9%, нітротирозину на 49,3%, зниження експресії iNOS в мітохондріях головного мозку на 50%, підвищення активності ГР на 77,3%, ГПР на 82,3% і Г-S-T на 79%, цистеїну на 47,3%.

Отримані результати дозволили автору зробити припущення, що С-3 в якості скавенджера NO сприяє підвищенню його біодоступності та зменшує нейротоксичність, а також нормалізує тіол-дисульфідну рівновагу, що може регулювати SH/NO-механізми нейродеструкції/нейропротекції.

При оцінці специфічних показників навчання в радіальному лабіринті було виявлено, що через 29 діб після ВК у тварин сформувався стійкий когнітивний дефіцит. Введення С-3 призводило до підвищення загальної

рухової активності і зниження помилок референтної на 57,1% ($p < 0,05$) і робочої пам'яті на 50% ($p < 0,05$), що свідчило про позитивну дію даної сполуки на когнітивно-мнестичні функції ЦНС після ВК.

Таким чином, результати дослідження підтверджують об'єктивність комплексного підходу, що включає в себе комп'ютерну програму, скринінг *in vitro* та *in vivo*, до цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду похідних ксантину.

Наукова новизна отриманих результатів. Поза сумнівом, ступінь новизни роботи високий, оскільки мова йде про підвищення якості та ефективності цілеспрямованого створення нових препаратів-антиоксидантів.

Вперше для оптимізації цілеспрямованого пошуку скавенджерів NO в ряду знову синтезованих сполук створена комп'ютерна програма віртуального скринінгу за допомогою алгоритмів машинного навчання з використанням моделі «градієнтного бустінга».

Вперше за допомогою нової комп'ютерної програми для прогнозу антиоксидантної активності серед знов синтезованих похідних ксантину була виявлена сполука – гідразид 8-бензиламіно-теофілініл-7-оцтової кислоти (С-3) з властивостями скавенджера NO, яка в досліджах *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 протиішемічну дію, за силою якої перевершує референс-препарати (мілдронат, мексидол і пірацетам).

Вперше показано, що С-3 на моделі інфаркту міокарда і ВК гальмує експресію mPINK і iNOS та 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 (у 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 роботи полягає у тому, 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, 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 може сприяти створенню нового покоління ефективних лікарських препаратів, що переривають NO-залежні ланки ішемічного пошкодження міокарда та головного мозку. Результати досліджень впроваджені в

педагогічний процес та науково-дослідну роботу на 4 кафедрах фармакології/медичної та фармацевтичної інформатики вищих медичних навчальних закладів України.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (Запоріжжя, 2015); двадцятому Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» (Запоріжжя, 2016); двадцять четвертій Українській конференції з органічної хімії (Полтава, 2016); Всеукраїнській науково-методичній відеоконференції з міжнародною участю «Актуальні питання дистанційної освіти та телемедицини – 2016» (Запоріжжя, 2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю з дня народження І.Г. Герцена «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» для студентів та молодих вчених (Одеса, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017» (Запоріжжя, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції (до 50-річчя заснування ЗДМУ) «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2018» (Запоріжжя, 2018); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2019» (Запоріжжя, 2019).

Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями в цій галузі. Вони викладені лаконічно, що свідчить про відповідні досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи. В якісному і кількісному (7) характері і обсязі вони повністю відповідають матеріалу, опублікованому у фахових виданнях, викладеному в дисертації та авторефераті. Зроблені висновки характеризують основні досягнення, здобуті і викладені в дисертації. Зміст автореферату повністю відбиває основні положення дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту й 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. В дисертаційній роботі та авторефераті суттєвих недоліків не виявлено. І дисертація і автореферат написані красиво, логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення.

При позитивній характеристиці дисертаційної роботи Риженко Віктора Павловича слід звернути увагу на зауваження.

Зауваження:

1. Робота перевантажена цифровим матеріалом.

2. Для експериментальних досліджень використовували дозу С-3, яку розраховували на моделі церебральної ішемії. Для оцінки протиішемичного активності на моделях робочої гіпоксії і інфаркту міокарда було б правильним визначити ЕД₅₀ для цих моделей ішемії міокарда.

3. Для оцінки впливу С-3 на енергетичний обмін міокарда доцільним було визначати інтермедіати циклу Кребса, аденілові нуклеотиди не в безбілковому екстракті гомогената міокарда, а окремо в цитоплазмі і мітохондріях.

Ці зауваження і побажання не є принциповими, не впливають на загальну високу оцінку рецензованої роботи та загальну позитивну оцінку дисертації, а також не зменшують її високу наукову і практичну значимість.

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

1. Вами отримані переконливі дані про вплив С-3 на експресію білка теплового шоку HSP70 в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку щурів з церебральною ішемією. Чи можна це розцінювати як вплив С-3 на ланки ендогенної нейропротекції? Який механізм цього впливу?

2. Вами встановлено, що С-3 в умовах інфаркту міокарда активує малат-аспартатний шунт. Еволюцією передбачено для підтримки біоенергетичних реакцій в умовах гіпоксії та ішемії в органах і тканинах кілька компенсаторних шляхів енергії. Яке значення серед них має малат-аспартатний шунт? Чи можлива його антиоксидатна модуляція?

3. С-3 проявляє властивості скарвенджера монооксиду азоту. Ви можете спрогнозувати поведінки С-3 при ендотеліальній дисфункції? Як буде вести себе ця сполука щодо нітроксидергічної системи при ЕД?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертація Риженка Віктора Павловича «Оптимізація цілеспрямованого пошуку скарвенджерів 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 присвячена рішення актуальної задачі фармакології – цілеспрямованому пошуку скарвенджерів NO, в результаті комплексного підходу виявлена сполука серед похідних ксантину – гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти з властивостями скарвенджера NO і експериментально обґрунтовано перспективи її застосування в комплексній терапії інфаркту міокарда та мозкового інсульту в якості антиоксидантного і протиішемичного засобу.

Робота володіє практичним значенням, тому що обґрунтовує доцільність використання скарвенджерів NO як перспективного напрямку нейропротекції в умовах гострого порушення мозкового кровообігу, а також розроблено і створено програму віртуального скринінгу речовин з потенційною антиоксидантною активністю по інгібуванню NO у вигляді веб-додатка.

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.

Професор кафедри
медичного та фармацевтичного права,
загальної і клінічної фармації
Харківської медичної академії
післядипломної освіти МОЗ України
доктор медичних наук, професор

