РЕЦЕНЗІЯ
на дисертаційну роботу
Акішевої Аліни Сергіївни
на здобуття наукового ступеня доктора філософії
«In silico аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну»
за спеціальністю 091 – Біологія

Дисертаційна робота Акішевої Аліни Сергіївни на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія присвячена дослідженню механізмів анальгетичної та протизапальної дії алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну методами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки *in silico*.

Актуальність дослідження.

Актуальним питанням сучасної медицини на теперішній час залишається пошук та створення нових ефективних анальгетичних та протизапальних засобів, які відрізняються високою фармакологічною активністю та безпечністю. За оцінками всесвітньої організації охорони здоров`я щодня більше тридцяти мільйонів людей по всьому світу використовують знеболювальні засоби для подолання болю різної етіології. Біль є симптом багатьох захворювань, особливо на фоні хронічних хвороб, він трансформується в хронічний больовий синдром, який супроводжується структурними та функціональними змінами у ЦНС та негативним впливом на емоційний і психологічний стан людини. Звертаючи увагу на те, що процеси запалення та виникнення болю є взаємозалежними процесами, анальгетичну терапію проводять шляхом застосування протизапальних засобів. Але, існуючи анальгетики (нестероїдні протизапальні лікарські засоби) на фармацевтичному ринку мають обмежену ефективність по відношенню до певних типів болю та супроводжуються побічною дією, що знижує рівень їх безпечності. З іншого боку, складність патфізіологічних механізмів, які визначають больовий синдром не дають можливості однозначно провести ідентифікацію мішеней для його усунення шляхом відповідної терапії, тому актуальним є вивчення та розуміння механізмів виникнення різних типів болю та, відповідно, механізмів дії нових лікарських засобів.

Слід зазначити, що дослідження фармакологічної активності лікарських засобів з залученням тварин стикається з низкою питань, які пов'язані з етичними і правовими аспектами участі тварин у наукових експериментах та недостатнім обгрунтуванням що до їх використання, особливо, якщо є альтернативні методи досліджень. До таких методів належить комп`ютерне молекулярне моделювання,

що дозволяє вивчати молекулярні механізми роботи білків, конформації та орієнтації ліганду в активному центрі білкової молекули, оцінювати вплив змін в структурі лігандів на їх афінність, досліджувати взаємодії атомів та молекул за певний період часу, проводити моделювання фармакофорів. Таким чином, комп'ютерні технології дають розуміння щодо молекулярних механізмів патологічних процесів та активно застосовуються на всіх етапах створення нових лікарських засобів, для оптимізації існуючих ліків і пошуку сполук-лідерів.

Тому, дослідження антиноцицептивних механізмів дії анальгетичного засобу пропоксазепаму шляхом *in vitro* та *in silico* аналізу визначає актуальність теми дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота виконана в межах наукових тем кафедри фізіології, здоров'я і безпеки людини та природничої освіти ОНУ імені І. І. Мечникова «Дослідження лікувально-профілактичних властивостей раковин молюсків Чорного моря» (№ ДР 0119U000499), «Дослідження механізмів розвитку патологічних станів у людини та тварин під впливом ксенобіотиків» (№ ДР 0124U004566) та ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН України» «Експериментальне дослідження змін тканин ротової порожнини у щурів під впливом ксенобіотиків та гіпоксії» (№ ДР 0120U105477), «Експериментальне обґрунтування розробки профілактичних засобів для запобігання метаболічних порушень, які викликані ксенобіотиками воєнного походження» (№ ДР 0123U102321).

Структура та зміст дисертації.

Дисертаційна робота містить анотацію, вступ, п'ять розділів, висновки, список використаних джерел, який складається з 148 джерел (6 кирилицею і 142 латиницею) та налічує 22 рисунки та 23 таблиці. Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 159 сторінок комп'ютерного тексту.

У вступі дисертаційної роботи обґрунтовано актуальність теми, розкрита основна мета роботи та визначені задачі дослідження, відзначено наукову новизну роботи та практичне значення отриманих результатів, вказані особистий внесок дисертанта та апробації результатів дослідження.

У першому розділі дисертаційної роботи розглядаються механізми розвитку болю та підходи до їх фармакотерапії. Наведена класифікація різних типів болю і механізми сприйняття та передачі больових сигналів. Охарактеризовані молекулярні мішені та механізми, які залучені у ноцицептивну та запальну відповідь, розуміння яких визначає нові терапевтичні стратегії, що спрямовані на ефективність анальгетичної та протизапальної дії на фоні мінімальних проявів побічних ефектів. В роботі описано значення людського

сироваткового альбуміну, структурні зміни якого говорять про наявність патологічних процесів, що супроводжуються запаленням. Охарактеризовано основні місця зв'язування та типи взаємодій, що дозволяють спрогнозувати конкуренцію між відповідними лігандами. Розглянуто вклад циклооксигенази та продуктів каскаду арахідонової кислоти, а також вклад брадикінінових рецепторів у формування больового синдрому. Описані потенціалзалежні калієві канали, які мають ключове значення у регуляції збудливості нейронів, зокрема в контексті передачі больових сигналів. Охарактеризовані NMDA-рецептори з позиції регуляторів нейропластичності, пов'язаної з больовими процесами в ПНС, а також як ключові учасники синаптичної передачі збудження та пластичності у ЦНС. Наведена характеристика каналів транзиторного рецепторного потенціалу (TRP), які діють як молекулярні датчики болю та свербожу, реагуючи на фізичні та хімічні подразники. Описані ліганди ванілоїдних рецепторів, які виступають в якості агоністів та антагоністів. Охарактеризовані адренергічні рецептори, зокрема α_1-адренергічні рецептори, що відіграють важливу роль у модуляції болю, особливо в контексті невропатичного болю. Дисертантом робиться акцент саме на комплексному підході до регуляції больової чутливості, що відкриває нові можливості для створення високоспецифічних та безпечних анальгетиків. В роботі розглядаються анальгетичні та протизапальні засоби, а також механізм їх дії. Основна увага приділяється похідним бензодіазепінів, які на фоні широкого спектру своєї фармакологічної активності є потенційними анальгетиками, зокрема, «Пропоксазепам», який відрізняється унікальним фармакодинамічним профілем, оскільки він одночасно пригнічує як гострий, так і хронічний біль, а також має протизапальні та протисудомні властивості. Для уточнення механізмів протизапальної та анальгетичної дії пропоксазепаму застосовується *in silico* аналіз, який охарактеризовано як метод молекулярного докінгу та метод молекулярної динаміки.

У другому розділі дисертаційної роботи наведено опис методик та основних етапів експериментальних досліджень.

У третьому розділі дисертаційної роботи приводиться аналіз результатів дослідження. Описані результати дослідження інгібування термічної денатурації бичачого сироваткового альбуміну похідними 1,4-бенздіазепіну та референтною сполукою ібупрофеном. Розраховані параметри, на основі яких були визначені фізико-хімічних характеристик сполук, що впливають на стабілізацію структури альбуміну в умовах термічної денатурації. Методом докінг-аналізу було розраховано енергії взаємодії між досліджуваними лігандами та різними місцями

зв'язування (діазепановим і ібупрофеновим) людського сироваткового альбуміну. Визначено амінокислотні залишки відповідних сайтів, які характеризують тип і інтенсивність взаємодії досліджуваних сполук з людським сироватковим альбуміном через водневі та Ван-дер-Ваальсові взаємодії.

У четвертому розділі розглядаються механізми анальгетичної дії похідних 1,4-бензодіазепіну. Шляхом проведення молекулярного докінгу пропоксазепаму з рецептором брадикініну, ЦОГ-1 і ЦОГ-2 були проаналізовані місця зв'язування, які відрізнялись від місць зв'язування з іншими контрольними лігандами (ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, кеторолак, диклофенак). Описаний механізм та розрахована енергія взаємодії похідних 1,4-бензодіазепінів з потенціалозалежними калієвими каналами у порівнянні з референтними сполуками - флупіртин, ретигабін та 4-амінопіридин; з NMDA-рецептором в порівнянні з референтними сполуками - кетамін, кінуренова кислота та N-метил-D-аспартат; з α1A адренергічним рецептором у порівнянні з референтними сполуками - оксиметазоліном, норадреналіном, L-епінефрином; з рецептором Фосфодіестераза 4; з TRPV1 рецепторами у порівнянні з капсазепіном, капсаїцином, резиніфератоксином та референтною сполукою SB-366791; також з канабіноїдними рецепторами. Для всіх експериментальних серій було визначено внесок зв'язків окремих амінокислотних залишків у загальну енергію взаємодії досліджуваних сполук з відповідними активними центрами мішеней.

У ***п'ятому розділі*** дисертаційної роботи авторкою проведено глибокий аналіз та узагальнення отриманих результатів дослідження. Матеріали даного розділу вказують на досягнення поставленої мети дослідницької роботи.

Відомості про дотримання академічної доброчесності.

В дисертаційній роботі відсутні ознаки порушення академічної доброчесності.

Ступінь обґрунтованості результатів та їх наукова новизна.

Обґрунтованість результатів дослідження не викликає сумніву, всі дослідження виконано на високому методичному рівні, дизайн дослідження побудовано логічно та послідовно, отримані результати відповідають поставленій меті та завданням роботи, результати досліджень узагальнені, детально проаналізовані та зведені у відповідні таблиці та рисунки. Таким чином, ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій має високий рівень, про що свідчить і публікації результатів у фахових виданнях.

За результатами роботи були сформульовані висновки щодо наукової новизни дисертаційної роботи:

1) Отримані результати досліджень дозволяють поглибити знання про молекулярні механізми реалізації протизапальної та анальгетичної дії алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну через їхній вплив на білкові молекули.

2) Вперше, здійснено ідентифікацію нових молекулярних мішеней для алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну, що розширює уявлення про їхню протизапальну та анальгетичну дію.

3) Встановлено специфічні сайти зв'язування пропоксазепаму з ключовими білковими мішенями, зокрема ЛСА, брадикініновими рецепторами, Kv7.2, NMDA-рецептором та фосфодіестеразою 4, що обґрунтовує його потенційну роль у модуляції больової чутливості та запального процесу.

4) Отримані дані дозволяють не лише глибше зрозуміти механізми дії цих сполук, а й сприяють розробці нових підходів до створення ефективних анальгетичних та протизапальних засобів із покращеним фармакологічним профілем.

За своїм практичним значенням, отримані результати дисертаційної роботи можуть використовуватись в експериментальній та клінічній фармакології для подальшого вивчення механізмів дії похідних 1,4-бензодіазепіну і їхнього потенційного застосування в лікуванні больових синдромів та запальних процесів, а також у створенні нових біологічно-активних сполук з анальгетичними властивостями.

Повнота викладення змісту дисертаційної роботи в опублікованих працях.

Результати дисертаційної роботи Акішевої Аліни Сергіївни повністю відображено в 18 наукових працях: 5 статей у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у виданні, що входить до міжнародної наукометричної бази Scopus та Web of Science, 12 тез доповідей у матеріалах конференцій.

Оцінка рівня виконання поставленого наукового завдання та оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності.

Аналіз змісту дисертаційної роботи свідчить про високий науково-методичний рівень виконання, але, в ході рецензування роботи було виявлено деякі технічні недоліки.

Дискусійні положення:

- стор. 35 – можливо, потрібно уточнити, що собою уявляє сполука MDR-652;

- стор. 42 – у третьому абзаці при згадуванні досліджень протизапальної та знеболювальної дії пропоксазепаму доцільно було б вказати посилання на ці дослідження

- стор. 49 – чим обумовлено вибір 4 % концентрації БСА при вивченні протективної активності 1,4-бензодіазепінів у моделі термічної денатурації БСА. pH робочого розчину БСА дорівнював 7,4, а фізико хімічні характеристики сполук (дипольний момент та коефіцієнт розподілу) визначався при pH 7. Не має посилання на першоджерело. Також, чим обумовлено різний концентраційний діапазон сполук: тест-зразки готували з вихідних метанольних розчинів сполук у концентраційному діапазоні 15–60 мМ, при цьому концентрації ібупрофену становили 1,5–20 мкМ, а похідних 1,4-бенздіазепіну – 0,6–6 мкМ? Чим обумовлений вибір в якості референт препарату ібупрофену?

- стор. 61 – таблиця 3.3: «на основі отриманих даних щодо енергії взаємодії між похідними 1,4-бензодіазепінів та людським сироватковим альбуміном у різних сайтах зв'язування», який тип зв'язків вносить максимальний вклад в реалізацію взаємодії з урахуванням відповідних амінокислотних залишків альбуміну?

- стор. 75 – на основі отриманих даних з приводу того, що «взаємодія пропоксазепаму з ЦОГ2 має більш виразний специфічний характер порівняно з ЦОГ-1, тому взаємодія пропоксазепаму з місцем, близьким до активного центру в ЦОГ-2, може частково впливати на активність цього ензиму», чи можна передбачити, буде пропоксазепам виступати прямим чи непрямим інгібітором цього ферменту?

- стор. 82-84 – при створенні візуалізації розташувань досліджених сполук у специфічних місцях зв'язування було обрано різні програми: у випадку зв'язування цих сполук з амінокислотами KCNQ2 використовувалась програма LigPlot+; з амінокислотами Kv3.1 - DiscoveryStudio2021. Чим це обумовлено?

- стор. 89 (табл. 4.10), стор 94 (табл. 4.12) чому для визначення енергії зв'язування досліджуваних сполук з α1A адренергічним рецептором та з рецептором ФДЕ використовуються різні програми, відповідно, AutoDock Vina та Schrödinger Maestro Glide? Як корелюють отримані дані між собою та чим обумовлено такий вибір програм?

- стор. 102 – як корелюють між собою та доповнюють отримані дані докінг-аналізу взаємодії пропоксазепаму з рецепторами TRPV1 із застосуванням програми Maestro Schrödinger Suite для визначення афінності зв'язування сполук з білковою мішенню та (стор. 107) отримані дані з QSAR аналізу за моделлю kpls_desc_19?

Наявні зауваження не є принциповими і не зменшують наукової цінності та проблемного значення основних наукових положень дисертаційної роботи і не впливають на загальне позитивне враження від роботи в цілому.

Загальний висновок по дисертаційній роботі.

Дисертаційна робота Акішевої Аліни Сергіївни «*In silico* аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну» є актуальною, цілісною та завершеною науковою працею, яка відзначається науковою новизною, важливим теоретичним і практичним значенням, та виконанням на високому науково-методичному рівні. Дисертаційна робота відповідає вимогам наказу МОН України №40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (з наступними змінами) та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р. Здобувач Акішева Аліна Сергіївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 Біологія.

Рецензент:
доцент кафедри
загальної та клінічної фармації
Одеського національного
університету імені І.І. Мечникова,
к.б.н., доцент Олександра АЛЕКСАНДРОВА

ОСОБИСТИЙ ПІДПИС О. Александровой
ЗАСВІДЧУЮ
ВІДДІЛ КАДРІВ
ІНСПЕКТОР ВІДДІЛУ КАДРІВ