

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Акішевої Аліни Сергіївни
на здобуття наукового ступеня доктора філософії

«*In silico* аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксипохідних 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 анальгетичного та протизапального ефектів алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну методами молекулярного докінгу та молекулярної динаміки *in silico*.

Актуальність дослідження.

Проблематика болю та запалення, а також пошук нових анальгетичних і протизапальних засобів з покращеним профілем безпеки та ефективності залишається однією з провідних у сучасній фармакології та медицині. Наявні препарати, зокрема нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) і опіоїди, мають низку серйозних побічних ефектів, що зумовлює необхідність пошуку альтернативних молекулярних мішеней і нових хімічних структур. Водночас, запальні процеси часто є фундаментальною складовою багатьох хронічних і гострих захворювань, що підкреслює потребу у створенні препаратів із подвійною — анальгетичною та протизапальною — активністю.

У цій роботі досліджено молекулярні механізми анальгетичної та протизапальної дії алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну, зокрема інноваційного препарату пропоксазепам, який проявляє полімодальний механізм дії.

Оцінка протизапальної активності досліджуваних сполук базується на різних експериментальних моделях запалення — гострого, підгострого та хронічного, що є важливим для комплексного розуміння їх фармакологічного профілю. Водночас, застосування тваринних моделей у фармакології супроводжується етичними викликами та вимагає наукового обґрунтування, що стимулює пошук альтернативних методів досліджень. Це підкреслює важливість застосування альтернативних підходів, зокрема методів комп'ютерного моделювання (*in silico*), які дають змогу детально досліджувати молекулярні механізми дії препаратів, оптимізувати пошук нових сполук та мінімізувати необхідність у великій кількості експериментів на тваринах.

Вивчення просторової структури комплексів між білками-мішенями та лігандами дозволяє глибше розкрити механізми дії препаратів та підвищити ефективність створення перспективних фармакологічних агентів.

З огляду на це, дослідження механізмів дії методом *in vitro* та *in silico* є важливою складовою роботи і **обґрунтовує актуальність теми дисертаційного дослідження.**

Таким чином, обрана тема дослідження є сучасною, актуальною і відповідає пріоритетам розвитку біології, фармакології і молекулярної медицини.

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 складається із анотації, вступу, 5 розділів, висновків, списку цитованої літератури, який налічує 148 джерел (6 кирилицею і 142 латиницею) та містить 22 рисунки, 23 таблиці. Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 159 сторінок машинописного тексту.

У вступі дисертаційної роботи міститься обґрунтування актуальності теми, визначення мети та завдань дослідження, а також підкреслення наукової новизни і практичної цінності результатів.

У першому розділі дисертаційної роботи здійснено всебічний аналіз механізмів виникнення болю та основних фармакотерапевтичних підходів до його лікування. Розглянуто біологічні процеси, що забезпечують сприйняття і передачу больових сигналів, а також запропоновано класифікацію різних форм болю. Значна увага приділена вивченню молекулярних мішеней, які беруть участь у ноцицептивних і запальних реакціях, зокрема іонних каналів, рецепторів нейромедіаторів, прозапальних цитокінів і ферментів, що регулюють синтез запальних медіаторів. Показано важливість детального вивчення цих мішеней для створення ефективних терапевтичних засобів із мінімальним ризиком побічних ефектів.

В розділі також наведено характеристику сироваткового альбуміну, структурні зміни якого можуть свідчити про різноманітні патологічні стани.

Також в даному розділі описані характеристики та особливості обраних білкових мішеней (циклооксигенази, брадикінінові рецептори, потенціалзалежні калієві канали, рецептор N-метил-D-аспартату, канали транзиторного рецепторного потенціалу, $\alpha 1$ А-адренорецептори і фосфодіестераза 4). Проаналізовано механізми дії протизапальних і знеболювальних препаратів, зокрема представлені особливості фармакологічного профілю бензодіазепінів у цілому та пропоксазепаму як перспективного кандидата для подальших досліджень.

Завершується розділ оглядом сучасних *in silico* методів, які застосовуються для вивчення молекулярних основ функціонування білкових структур, що підкреслює інноваційність підходів, використаних у дослідженні

Другий розділ дисертаційної роботи присвячено опису методик та основних етапів експериментальних досліджень.

У **третьому розділі** дисертації наведено результати дослідження здатності похідних 1,4-бензодіазепіну інгібувати термічну денатурацію бичачого сироваткового альбуміну, порівняно з ібупрофеном як референтною сполукою. Проведено визначення фізико-хімічних характеристик досліджуваних сполук, що впливають на стабілізацію конформації альбуміну при нагріванні. За допомогою молекулярного докінг-аналізу вивчено взаємодії цих речовин з різними сайтами зв'язування людського сироваткового альбуміну — діазепамовим та ібупрофеновим. Встановлено ключову роль окремих амінокислотних залишків у формуванні типу та сили зв'язування, зокрема через водневі та Ван-дер-Ваальсові взаємодії. Особливу увагу приділено внеску гідрофобних амінокислот, які формують стабільні контакти з лігандами у зазначених сайтах, що сприяє кращому розумінню молекулярних механізмів дії пропоксазепаму та інших досліджуваних сполук.

У **четвертому розділі** виконано всебічний аналіз механізмів взаємодії досліджуваних похідних 1,4-бензодіазепіну з білковими мішенями, які беруть участь у розвитку запальних реакцій та больових синдромів. Детально досліджена участь окремих амінокислотних залишків у формуванні загальної енергії взаємодії досліджуваних сполук (пропоксазепам, кеторолак, целекоксиб, ацетилсаліцилат, диклофенак та ібупрофен) з активними центрами циклооксигенази-1, циклооксигенази-2 та рецептора брадикініну. Окрім цього, розглянуто механізми взаємодії похідних 1,4-бензодіазепіну з різноманітними мішенями, серед яких потенціалозалежні калієві канали (у порівнянні з референтними препаратами флупіртином, ретигабіном та 4-амінопіридином), NMDA-рецептори (порівняно з кетаміном, кінуреновою кислотою та N-метил-

D-аспартатом), α 1A-адренергічні рецептори (порівняно з оксиметазоліном, норадреналіном і L-епінефрином), рецептор фосфодіестерази 4, рецептори TRPV1 (у співставленні з капсазепіном, капсаїцином, резиніфератоксином та референтною сполукою SB-366791) та канабіноїдні рецептори. Для кожного досліджу було визначено внесок окремих амінокислотних залишків у формування енергії зв'язування між досліджуваними сполуками та активними центрами білків, що дозволило розширити розуміння молекулярних основ фармакодинаміки цих лігандів.

У п'ятому розділі дисертації наведено детальний та комплексний огляд, а також систематизацію отриманих результатів дослідження.

Відомості про дотримання академічної доброчесності. В дисертаційній роботі відсутні ознаки порушення академічної доброчесності.

Ступінь обґрунтованості результатів та їх наукова новизна. Обґрунтованість та наукова цінність отриманих результатів дисертаційного дослідження підтверджуються їх публікацією у фахових наукових виданнях.

Наукова новизна роботи полягає у наступному:

1. Розширено розуміння молекулярних механізмів, через які алкоксіпохідні 1,4-бензодіазепіну реалізують свої протизапальні та анальгетичні ефекти шляхом взаємодії з білковими мішенями.

2. Вперше виявлено нові молекулярні мішені для цих сполук, що дозволяє глибше оцінити їхню фармакологічну активність.

3. Встановлено специфічні ділянки зв'язування пропоксазепаму з ключовими білковими структурами, зокрема сироватковим альбуміном людини, брадикініновими рецепторами, калієвими каналами Kv7.2, NMDA-рецептором та фосфодіестеразою 4, що свідчить про його можливу роль у регуляції больових та запальних процесів.

4. Отримані результати не лише сприяють поглибленню знань про механізми дії даних сполук, а й відкривають перспективи для розробки нових анальгетиків і протизапальних препаратів із покращеним профілем ефективності та безпеки.

Практична значущість дослідження:

1. Виявлено можливі молекулярні мішені пропоксазепаму (ЛСА, NMDA-рецептор, фосфодіестераза 4, брадикініновий рецептор та інші), що дає змогу обґрунтовано пояснити його анальгетичні та протизапальні властивості та спрямувати подальші фармакологічні дослідження на детальне вивчення цих цілей.

2. Встановлено низький ступінь спорідненості з ЦОГ-1, що свідчить про потенційно знижений ризик розвитку ульцерогенних побічних ефектів порівняно з традиційними нестероїдними протизапальними препаратами.

3. Визначено структурні особливості взаємодії з білковими мішенями, які можуть бути використані для розробки нових похідних 1,4-бензодіазепіну з підвищеною біоактивністю та більш точною цільовою дією.

4. Показано активність у стабілізації білкових структур *in vitro*, зокрема захисний ефект проти термічної денатурації бичачого сироваткового альбуміну, що свідчить про потенціал протизапального застосування.

Повнота викладення змісту дисертаційної роботи в опублікованих працях. Результати дисертаційної роботи Акішевої Аліни Сергіївни повністю відображено в 18 наукових працях: 5 статтях 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. Загальна структура дисертації відповідає типовим вимогам до оформлення наукових робіт та регламенту ДАК України щодо дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії. Однак під час рецензування були виявлені певні зауваження стосовно оформлення рукопису та його змістового наповнення, а також низка технічних недоліків і помилок.

До змісту дисертаційної роботи є наступні зауваження, запитання та побажання:

1. У тексті роботи виявлено поодинокі орфографічні помилки технічного характеру, а також іноді трапляються недоречні формулювання та неправильні відміни слів.
2. У вашій роботі використовувались різні підходи до енергетичної оцінки взаємодій (Glide, MM-GBSA, AutoDock Vina). Які переваги та недоліки кожного з цих методів, і який із них, на вашу думку, забезпечує найбільш точну кореляцію з експериментальними даними? Наведіть приклади, як порівняння методів може підвищити достовірність висновків.
3. Опишіть детально процедуру підготовки як лігандів, так і білкових структур перед проведенням молекулярного докінгу. Які кроки ви вважали критичними для забезпечення коректності моделювання взаємодії і як контролювали якість підготовлених моделей?

4. Як ви інтегрували методи молекулярної динаміки у вашу роботу після докінгу, і які особливості динамічної поведінки білково-лігандних комплексів були виявлені? Як молекулярна динаміка допомогла уточнити конформаційну стабільність і функціональну релевантність взаємодій?

Однак, вищезазначені зауваження не є принциповими, не носять систематичний характер і не впливають на основні наукові положення та загальне позитивне враження від роботи, а також не зменшують наукову та практичну цінність дисертаційної роботи.

Загальний висновок по дисертаційній роботі

Оцінка поданих у дисертаційній роботі Акішевої Аліни Сергіївни «*In silico* аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну» матеріалів з урахуванням їхньої актуальності, наукової новизни, теоретичної цінності, практичної значущості, обґрунтованості та достовірності отриманих результатів свідчить про високий науковий рівень виконаної роботи. Дисертаційна робота є актуальною, цілісною та завершеною науковою працею, яка 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:

завідувач кафедри
загальної та клінічної фармації
Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова,
д.м.н., професор



Олександр НЕФЬОДОВ



Засвідчує
Доктор О. Нефьодова
Доктор Т. Шевченко
Доктор В. Шевченко