

ВІДГУК

офіційного опонента, директора Державної Установи «Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України», доктора біологічних наук Ядловського Олега Євгеновича на дисертаційну роботу АКИШЕВОЇ Аліни Сергіївни на тему «*In silico* аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну», представлену до захисту у разову спеціалізовану вчену раду Одеського національного університету імені І.І. Мечникова для розгляду та проведення захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми дисертації.

Больові синдроми є одними з найбільш розповсюджених патологічних станів. Відомо, що близько половини дорослого населення планети відчуває головний біль протягом року, а на хронічний біль страждає до 55% планети. Біль може призводити до зниження якості життя, втрати працездатності, інвалідизації, загибелі пацієнту. Тому проблема регуляції болю важлива та актуальна. На сьогодні одне з центральних місць боротьби з болем займає фармакотерапія. На сьогодні знеболювальні препарати можна розділити на декілька великих груп. Однак представники кожної з них не можуть у повній мірі бути задовільними вимогам клініки. Опіїдні анальгетики ефективні при сильному болю, однак їм притаманні серйозні небажані ефекти, включаючи фізичну та психічну залежність, наркоманію, пригнічення дихання, ускладнення зі сторони серцево-судинної системи, тощо. Нестероїдні протизапальні засоби та анальгетики-антипіретики, як правило, ефективні при болю помірної або слабкої інтенсивності. Також їм притаманні побічні ефекти, які обмежують їх застосування – ульцерогенна, гепатотоксична, гематотоксична, нефротоксична дія та ін. Ад'ювантні анальгетики, препарати які як правило не є анальгетиками у прямому сенсі цього значення, але ефективні при певних видах болю, також не задовільняють клініці. Тому пошук та розробка знеболювальних засобів, які за ефективністю та/чи безпекою переважають існуючі аналоги важливо та актуально.

При створенні лікарського засобу, і анальгетику зокрема, важливо вивчення фармакодинаміки, фармакології безпеки, тощо. У цьому плані важливі підходи *in silico*, включаючи математичні методи прогнозу, оскільки вони уточнюють мішені, на які діє потенційний лікарський засіб, та дає можливість скоротити час та підвищити якість та знизити коштовність верифікаційних випробувань *in vivo*.

У цьому аспекті значний науковий інтерес викликає данне дослідження, яке є частиною великого комплексу робіт по вивченню молекулярних механізмів дії похідних 1,4-бензодіазепіну, та створення на основі сполуки-лідера новітнього лікарського засобу полімодальної дії, пропоксазепаму.

Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувачки.

Дисертаційна робота Акішевої Аліни Сергіївни виконана відповідно до плану наукових досліджень Одеського національного університету імені І.І. Мечникова і є фрагментом науково-дослідних 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).

Проведене дисертаційне дослідження вирізняється достатнім науковим рівнем та обґрунтованістю обраної методології. Використані автором сучасні підходи до аналізу проблеми дозволили досягти сформульованих у роботі цілей. Сформульовані висновки є логічним підсумком дослідження, мають належне теоретичне підґрунтя та підтверджуються отриманими результатами.

За темою дисертації опубліковано 18 наукових праць: 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. Основні положення дисертаційної роботи знайшли всебічне відображення в опублікованих наукових працях автора, що свідчить про повноту викладу змісту дослідження, обґрунтованість сформульованих висновків та належний рівень їх наукового оприлюднення.

Новизна представлених теоретичних та/або експериментальних результатів проведених здобувачкою досліджень, повнота викладу в опублікованих працях.

Надійність отриманих результатів та обґрунтованість наукових підходів, застосованих у дисертаційному дослідженні, підтверджуються публікацією статей автора у фахових виданнях, що відповідають чинним вимогам Міністерства освіти і науки України.

Дисертаційна робота характеризується суттєвим рівнем наукової новизни та знаходиться на межі математичних та біологічних досліджень. У роботі автор виявляє нові, не описані раніше аспекти молекулярних механізмів дії алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну, пов'язаних з анальгетичним і протизапальним потенціалом хімічного ряду ґрунтуючись на структурі сполуки-лідера (пропоксазепам) та інших сполук ряду. Зокрема:

1. Уперше сформульовано механізми взаємодії пропоксазепаму та інших похідних 1,4-бензодіазепіну з рецептором брадикініну, ізоферментами ЦОГ-1, ЦОГ-2, NMDA-рецептором, калієвим каналом Kv7.2, ферментом фосфодіестеразою 4 та TRPV1 рецептором, що дозволяє глибше зрозуміти механізми їх анальгетичної та протизапальної дії.

2. За результатами *in vitro*-досліджень встановлено, що алкоксипохідні 1,4-бензодіазепіну здатні запобігати денатурації сироваткового альбуміну, що свідчить про їхню потенційну стабілізуючу дію в умовах запального процесу.

3. Уперше показано, що пропоксазепам та його активний метаболіт (3-гідроксипропоксазепам) потенційно реалізують свою фармакологічну дію не через пряму активацію α_1 -адренорецепторів, а шляхом інгібування фосфодіестерази 4 (PDE4), що сприяє непрямому посиленню цАМФ-сигнального каскаду. Продемонстровано високу спорідненість пропоксазепаму до активного центру PDE4B, де він формує стабільні гідрофобні взаємодії з ключовими амінокислотними залишками (Phe446, Ile410), аналогічно до відомих інгібіторів ферменту.

4. Проведено детальний аналіз просторових параметрів взаємодії досліджуваних лігандів із білковими мішенями, що може стати основою для подальшого комп'ютерного моделювання.

5. Отримані дані формують наукове підґрунтя для майбутньої розробки комбінованих анальгетиків нового покоління з оптимізованим механізмом дії та покращеним профілем безпеки, що цілком відповідає сучасним тенденціям фармакологічної науки.

Наукова обґрунтованість отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційній роботі Акішевої А.С. притаманний високий рівень наукової аргументованості, та оптимальне співвідношення теоретичних та практичних аспектів теми. Авторці вдалось ефективно використати методи комп'ютерного моделювання, для рішення поставлених задач та поєднати їх підходами *in vitro*. Окремо слід вказати на демонстраційний матеріал, який дозволяє читачу оптимально сприйняти та зрозуміти отриманні результати, а також зрозуміти їх застосування. Узагальнення, сформульовані у висновках,

чітко відповідають цілям і завданням роботи, мають послідовний характер і підтверджуються емпіричними результатами.

Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності.

При виконанні дисертаційної роботи автором використано сучасні методики прогнозу iGEMDOCK v2.1, AutoDock, AutoDock Vina, Schrödinger Maestro Glide, PlayMolecule, а також їх комбінації для оптимальної оцінки мішеней для анальгетичної та протизапальної активності алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну. У цьому плані використання підходів *in vitro*, покращує розуміння фармакологічної дії сполук ряду та сполуки лідера.

Авторкою проведено моделювання молекулярної взаємодії досліджуваних сполук з низкою потенційних білкових мішеней — зокрема, NMDA-рецептором, рецепторами брадикініну, ферментами ЦОГ-1/ЦОГ-2, PDE4, сироватковим альбуміном, TRPV1, $\alpha 1$ -адренорецептором та канабіноїдним рецептором типу 1 (CB1). Також здійснено оцінку енергетичних характеристик зв'язування досліджуваних лігандів з білковими мішенями та вивчено протиденатураційну активність сполук у лабораторній моделі.

Результати дослідження вказують на досягнення поставленої мети й демонструють належний рівень теоретичної та практичної підготовки здобувачки, що повністю відповідає вимогам, які ставляться до здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Теоретичне та практичне значення результатів дослідження.

Результати, отримані в ході дисертаційного дослідження, вказують на фармакологічні властивості алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну, які доповнено та розширено на прикладі сполук найбільш активної сполуки ряду пропоксазепаму. А саме, автором ідентифіковано нові молекулярні мішені — таких як NMDA-рецептор, брадикінінові рецептори, фосфодіестераза 4 та інші. Це відкриває додаткові перспективи для розуміння регуляції болювого синдрому й запальних реакцій на молекулярному рівні сполук ряду.

З практичної точки зору, вагомим досягненням є використання поєднання досліджень *in silico* (комп'ютерне моделювання) та *in vitro*. Використані автором підходи дозволяють не лише уточнити потенційні механізми дії біоактивних сполук, а й скоротити обсяг досліджень за участю лабораторних тварин, що відповідає сучасним принципам біоетики.

Отримані дані становлять науковий інтерес для подальшого розроблення нових фармакологічних агентів з оптимізованим профілем безпеки та ефективності й можуть бути інтегровані у фахову підготовку майбутніх спеціалістів з фармакології, біомедицини та суміжних напрямів.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому.

Дисертаційна робота Акішевої А. С. викладена українською мовою і має структуру у відповідності до сучасних вимог. Для досягнення мети дослідження та вирішення поставлених завдань було застосовано комплекс сучасних методів, що забезпечило вивчення та оцінку механізмів дії досліджуваних сполук. 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.

В «Анотаціях» поданих українською та англійською мовами стисло наведені мету, задачі та основні положення дисертаційної роботи, викладено.

У «Вступі» дисертації авторка послідовно обґрунтовує наукову й практичну значущість обраної тематики, зосереджуючи увагу на актуальності вивчення молекулярних механізмів анальгетичної та протизапальної дії алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну. Аргументація необхідності дослідження базується на застосуванні сучасних комп'ютерних підходів, зокрема молекулярного докінгу та молекулярної динаміки. У цьому розділі чітко сформульовано мету й основні завдання дослідження, визначено наукову новизну та практичну значущість результатів. Також наведено інформацію про апробацію отриманих даних і наукові публікації здобувачки.

У першому розділі дисертації, який має назву «Механізми виникнення болю та фармакотерапевтичні стратегії», авторка здійснює ґрунтовний огляд наукової літератури як вітчизняного, так і міжнародного походження. Розглянуто сучасні уявлення про нейрофізіологічні та молекулярні основи процесів болю і запалення. Детально описано ключові біологічні мішені, що беруть участь у передачі больових сигналів, включно з іонними каналами, рецепторами нейромедіаторів, прозапальними цитокінами та ферментами. Окремо надано характеристики білкових структур, зокрема сироваткового альбуміну, та обґрунтовано їх роль у фармакологічній дії лікарських препаратів. Значну увагу приділено сучасним методам *in silico*, які забезпечують можливість моделювання взаємодії активних сполук із молекулярними мішенями. Також розглянуто перспективи застосування 1,4-бензодіазепінів, особливо пропоксазепаму, як перспективних агентів у контексті знеболювання та протизапального впливу. Цей розділ викладено на 25 сторінках та містить одну таблицю.

У другому розділі «Матеріали, об'єкти та методи дослідження» автор детально описує дослідницький об'єкт і методики обробки зібраних даних, які були застосовані для виконання поставлених завдань. Для проведення *in silico* аналізу використовувалося спеціалізоване програмне забезпечення, серед

якого iGEMDOCK v2.1, AutoDock, AutoDock Vina, Schrödinger Maestro Glide та PlayMolecule. Цей розділ розміщений на 8 сторінці дисертації.

У третьому розділі, що має назву «Механізми протизапальної дії та характеристики зв'язування пропоксазепаму і ряду похідних 1,4-бензодіазепіну з сироватковим альбуміном», наведено результати *in vitro* дослідів, який демонструє здатність пропоксазепаму інгібувати термічну денатурацію бичачого сироваткового альбуміну, а також досліджено його фармакологічний вплив. Окрім того, представлені дані *in silico* моделювання взаємодії пропоксазепаму з діазепамовим та ібупрофеновим сайтами зв'язування людського сироваткового альбуміну. Розділ містить 3 рисунки та 5 таблиць і розташований на 13 сторінці дисертації.

Четвертий розділ, який має назву «Молекулярні механізми анальгетичної дії похідних 1,4-бензодіазепіну», містить результати досліджень взаємодії пропоксазепаму та інших похідних 1,4-бензодіазепіну з низкою біологічних мішеней. Зокрема, розглянуто взаємодію з ЦОГ-1, ЦОГ-2, брадикініновим рецептором, потенціалозалежними калієвими каналами, NMDA-рецептором, $\alpha 1$ -адренорецептором, фосфодіестеразою 4, TRPV1 рецептором та канабіноїдними рецепторами. Матеріали розділу викладені на 43 сторінках та включають 17 рисунків і 19 таблиць.

У п'ятому розділі, що присвячений аналізу та узагальненню отриманих результатів, авторка дисертації системно і логічно оцінює зібрані дані, порівнюючи їх між різними етапами дослідження. У цьому розділі виділено основні наукові положення роботи, а також проведено їх зіставлення з існуючими літературними джерелами, що підтверджує наукову обґрунтованість висновків. Розділ розміщено на 16 сторінці і містить один рисунок.

Дисертаційне дослідження підсумовано шістьма узагальненими висновками, які чітко відповідають поставленим завданням, демонструють наукову новизну роботи та ґрунтуються на отриманих експериментальних результатах. Ці висновки точно відображають сутність і ключові результати проведеного дослідження.

Список використаної літератури включає 148 джерел із них 6 – кирилицею та 142 – латиницею, на які є посилання у роботі, оформлені згідно вимог. Дисертаційна робота завершується додатком, який включає список наукових праць дисертанта та додаткові рисунки.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці.

Використані авторкою підходи, а саме комбінаторне використання методів прогнозу, які були апробовані на ряду алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну,

можуть бути використані для розробки нових знеболювальних засобів серед похідних інших хімічних рядів.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

Зміст дисертації повною мірою відповідає заявленій темі дослідження та розкриває її основні положення. Робота виконана українською мовою та оформлена відповідно до чинних вимог. Загальна оцінка дисертації Акішевої А. С. є позитивною, проте слід звернути увагу на окремі зауваження та висловити побажання щодо подальшого удосконалення:

1. У тексті зустрічаються граматичні помилки та невдалі вирази та лінгвістичні обороти.

2. У роботі не є скорочення, які не винесено у список скорочень, що ускладнює сприймання тексту дисертаційної роботи.

3. В літературному огляді людський сироватковий альбумін (ЛСА) слід розглядати не як мішень, а як одну з моделей оцінки запалення, оскільки при запаленні уражується білкова частина тканин.

4. В літературному огляді розділі «1.2.2. Циклооксигенази та брадикінінові рецептори» не достатньо глибоко обговорюються мішені ЦОГ-1, ЦОГ-2, ЦОГ-3, та брадикінінові рецептори, що не відображає фактичної глибини роботи автора.

5. В літературному огляді, розділ, 1.3 Анальгетичні та протизапальні засоби, їх механізми дії досить поверхнево обговорюються анальгетичні та протизапальні засоби та їх механізми, адже вони не обмежуються опіоїдними анальгетиками та НПЗЗ.

6. У розділах власних досліджень бракує експериментальної верифікації експериментальних даних. Наявність верифікації підкреслила б фундаментальність досліджень дисертанта.

7. Бажано б, було уточнити вищу афінність метаболіту пропоксазепаму щодо $\alpha 1A$ -адренорецептора, вказавши серед яких лігандів (бо тут, як і в деяких інших твердженнях у дис.роботі в цілому, мають дискусійні фрагменти).

8. Дані, щодо «взаємодії циклооксигеназою-1,2», - дуже не переконливо. Вказується, що «Пропоксазепам демонструє недостатню спорідненість до циклооксигенази -1, оскільки взаємодії з нею переважно відбуваються через слабкі ван-дер-ваальсові зв'язки, а ідентифіковані ділянки зв'язування є неспецифічними». Одночасно, ван-дер-ваальсові зв'язки належать до слабких міжмолекулярних зв'язків і є переважаючими (основним типом зв'язків) у гідрофобному активному сайті зв'язування ЦОГ. Вказується, що «Взаємодія з циклооксигеназою -2 є малоефективною, оскільки зв'язування відбувається поблизу активного центру, залучаючи амінокислотні залишки одного домену».

Однак при цьому вільна енергія взаємодії пропоксазепаму з циклооксигеназами складає (-9 ккал/моль, ЦОГ-1) та (-7,3 ккал/моль, ЦОГ-2), а розташування молекули відзначено в активному сайті кожної з ізоформ ЦОГ відповідно (рис. 4.2, 4.3).

9. Розділ 5. Вказується «Раніше було встановлена висока ефективність пропоксазепаму в різних моделях запалення [16]. У тесті на набряк лапи, спричинений карагенаном, продемонстровано, що його інгібіторна активність залежить від дози, досягаючи максимального ефекту при дозі 10 мг/кг...». Оскільки інгібіція карагенанового набряку характеризує вплив циклооксигеназний шлях запалення, це дискутує з отриманими автором даними викладимини у висновку 3 щодо взаємодії пропоксазепаму з ЦОГ.

У процесі аналізу дисертаційної роботи виникло кілька запитань, здебільшого дискусійного характеру, на які хотілося б отримати відповіді від дисертанта:

1. Яке місце застосування пропоксазепаму в клініці, в аспекті отриманих автором даних, та який/які препарат від може замінити.

2. Чи можна розглядати дослідження щодо взаємодії досліджуваних сполук з активними центрами ЛСА в аспекті їх зв'язування з альбуміном та фармакокінетичних взаємодій?

3. Чи не залежить антиноцицептивна активність Пропоксазепам у від атому бром у структурі, а також ГАМК-ергічним компонентам фармакологічної дії, які маскують ноцицепцію, завдяки гальмівним, м'язоворелаксуючим ефектами, тощо.

4. Чи не є показаний автором вплив на брадикініновий рецептор 1-го типу, NMDA рецептор, фосфодієстераза 4, TRPV1 рецептор та каннабіноїдний рецептор 1, потенційними обмеженнями на застосування пропоксазепаму?

Незважаючи на окремі зауваження, дисертаційна робота подана до захисту вирізняється високим науковим рівнем. Виявлені недоліки не впливають на загальну якість дослідження, не зменшують його теоретичної та практичної значущості, наукової новизни і обґрунтованості сформульованих висновків.

Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності.

У процесі ознайомлення з дисертаційною роботою Акішевої Аліни Сергіївни на тему: «*In silico* аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксіпохідних 1,4-бензодіазепіну», а також під час аналізу його наукових публікацій, не було виявлено порушень принципів академічної доброчесності. Ознак плагіату, фальсифікації результатів або інших недоброчесних дій не зафіксовано. Виявлені текстові збіги відповідають

авторським публікаціям або є загальноновживаними науковими формулюваннями; усі цитати належно оформлені з посиланням на відповідні джерела.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Акішевої Аліни Сергіївни на тему: «*In silico* аналіз механізмів реалізації анальгетичного та протизапального ефектів алкоксипохідних 1,4-бензодіазепіну» присвячена комплексному аналізу механізмів взаємодії досліджуваних сполук з білковими мішенями, що беруть участь у розвитку больових синдромів та запальних процесів, а також оцінці їх потенціалу як фармакологічних агентів.

Дана робота повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затверджено Постановою Кабінету Міністрів України від 19.05.2023 № 502 щодо здобуття ступеня філософії та вимогам до оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України від 12 січня 2017 року № 40 (зі змінами внесеними згідно з наказом МОН України від 31.05.2019 № 759), а її авторка Акішева Аліна Сергіївна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

директор Державної Установи
«Інститут фармакології та токсикології
НАМН України»,
доктор біологічних наук



Олег ЯДЛОВСЬКИЙ

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ	
Підпис	<i>Ядловський О.</i>
Засвідчую	
Учений секретар	<i>О. / [підпис]</i>
" 05 "	05 20 25 р.