ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію **Якубовської В. В.** ***"Експериментальне дослідження протизапального та знеболюючого ефектів похідних (3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл) алкілкарбонових кислот"***, подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

1. Актуальність теми дисертації

Одним із найпоширеніших станів, від якого страждають мільйони людей у всьому світі, є біль. Медикаментозна корекція болю, як і самого запалення, є актуальною проблемою фармакотерапії. Дисертаційне дослідження В.В.Якубовської присвячене активному пошуку та вивченню нових молекул з протизапальною та знеболюючою діями, придатних для створення на їх основі більш ефективного та безпечного НПЗЗ, конкурентоспроможного з сучасними аналогами. Перспективними в цьому плані, як справедливо вважає здобувач, можуть бути похідні (3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4] триазино [2,3-с] хіназолін-6-іл) алкілкарбонових кислот, яким притаманний широкий спектр фармакологічних властивостей, що і слугувало підставою для проведення даного дослідження. Можна стверджувати, що обрана тема ґрунтується на сучасних досягненнях біологічної та медичної науки і створює передумову для кращого розуміння біохімічних та фізіологічних механізмів фармакологічної корекції деяких патологічних станів організму, насамперед, пов'язаних з больовим відчуттям.

Отже, обрана тема досліджень є важливою з огляду на фундаментальне та практичне значення результатів.

2. Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами

Дисертаційна робота виконана в рамках НДР кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова за темою *«Пошук та розробка нових шляхів оптимізації фармакологічних ефектів*

нестероїдних протизапальних засобів» (№ держреєстрації 0111U002571). Дисертант була співвиконавцем даної теми.

3. Новизна дослідження та отриманих результатів

В дисертаційній роботі вперше на великому експериментальному матеріалі доведено, що натрій (3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4] триазино [2,3-с] хіназолін-6-іл) алкілкарбоксилати (НТХАК) та їх галогеновмісні аналоги є носіями протизапальної та анальгетичної активностей, яка в найбільшій мірі притаманна натрієвій солі 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4] триазино [2,3-с] хіназолін-6-іл) бутанової кислоти *(лабораторна назва **DSK-38**)*. За ступенем протизапальної *(протинабрякової)* дії *(карагенінова модель)* за показником $ЕД_{50}$ вказана сполука удвічі переважала диклофенак, а за анальгетичною активністю *(при дії електричного, термічного та хімічного подразників)* наближалася або співставлялася до диклофенаку і кеторолаку, переважаючи метамізол. Автором вперше на моделі ад'ювантного артриту доведено, що за величиною лікувальної дії DSK-38 не поступається диклофенаку, а в окремих спостереженнях переважає його в ефективності за динамікою клінічних, гематологічних та біохімічних показників, проявляючи при цьому більшу беспечність щодо ШКТ. Вказана сполука є перспективною для місцевого застосування в стоматології у вигляді аплікації 4% розчину.

Саме патентом України на винахід №97586 «(3-R-8-R1-9-R2-10-R3-11-R4-2-оксо-2Н-[1,2,4] триазино [2,3-с]-хіназолін-6-іл) алкілкарбонові кислоти» захищена пріоритетність отриманих дослідником результатів.

4. Практичне значення результатів дослідження

Результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність подальшого вивчення в якості майбутнього знеболюючого та протизапального засобу нової сполуки – натрієвій солі 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино-[2,3-с]хіназолін-6-іл) бутанової кислоти (сполука DSK -38), а також визначена перспективність пошуку нових НПВЗ серед похідних [1.2.4]–триазинонів.

Результати дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес та наукову роботу кафедр фармакології Вінницького національного медичного

університету (ВНМУ) ім. М.І.Пирогова, Одеського національного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, Івано-Франківського національного медичного університету, Буковинського державного медичного університету та Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України».

5. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

В своїй роботі дисертант спирається на чіткі критерії щодо відтворення окремих патологічних моделей та використання надійних методичних підходів визначення відповідних механізмів патогенезу. Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів фізіолого-біохімічних та фармакологічних досліджень, що базуються на адекватних методах та достатній статистичній і математичній обробці отриманого цифрового матеріалу. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає цілям та задачам досліджень, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

6. Загальні відомості про роботу

Дисертаційна робота має загальноприйняту структуру і складається, як того потребує сьогодення, з анотацій на державній та англійській мовах, списку власних публікацій по темі дисертації, списку прийнятих скорочень, змісту, основної частини, яка включає розгорнутий вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, чотири розділи власних досліджень, узагальнення, аналіз та обговорення результатів дослідження, висновки, додатки та перелік використаних джерел, який містить 243 посилання, з них 192 кирилицею та 51 латиницею. Робота ілюстрована 37 рисунками та 26 таблицями.

7. 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 окремих результатів досліджень.

Перший розділ роботи – огляд літератури вміщує характеристику фармакологічних ефектів сучасних НПЗЗ та шляхи їх оптимізації. Ознайомлення з цим розділом роботи свідчить про досить високу актуальність питань, що підлягають аналізу. Основна ідея саме цієї частини роботи засвідчити необхідність розробки відповідних підходів до створення нових безпечних, високоефективних та конкурентно-спроможних знеболюючих та протизапальних засобів для корекції зазначених патологічних станів.

Другий розділ «Матеріали та методи дослідження» в цілому характеризує високий рівень методичних підходів при виконанні дисертаційної роботи. Загалом дослідження виконано на достатній кількості експериментальних тварин і всі маніпуляції було проведено згідно з положенням про використання тварин у біомедичних експериментах. Досліди проведено у лабораторіях кафедри фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова, атестованої комісією МОЗУ *(свідоцтво про атестацію № 023/13 від 05.03.2013р.)* та в ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМНУ" з урахуванням вимог належної лабораторної практики (GLP) згідно з Методичними рекомендаціями ДЕЦ МОЗУ [О.В. Стефанов, 2001], національними "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах" (Україна, 2011). Евтаназію тварин проводили передозуванням ефіру. Дотримання біоетичних норм засвідчено висновком комітету з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол № 10 від 23.11.2017р.). Скринінг досліджуваних сполук *(використано 25 оригінальних натрій (3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл) алкілкарбоксилатів (НТХАК) та їх галогеновмісних аналогів, синтезованих на кафедрі органічної та біоорганічної хімії Запорізького державного медичного університету під керівництвом професором Коваленко С.І.)* на наявність протизапального ефекту спочатку було здійснено методом молекулярного докінгу, як підходу до пошуку молекул з афінітетом до визначення біологічних мішеней. У подальшому кожну сполуку та еталонний НПЗЗ диклофенак в емпірично взятій дозі 10 мг/кг в/оч, протестовано на

протизапальну активність. Значна увага приділена відтворенню експериментальних еквівалентів найбільш адекватних клінічним проявам запалення та болю: на моделях карагенінового, зимозанового та формалінового набряків, а також моделюванням експериментального стоматиту і ад'ювантного артриту шляхом *(для останнього)* одноразового субплантарного введення 0,1 мл повного ад'юванта Фрейнда. Визначали антипроліферативну, антипірогенну та знеболюючу дії. Фармакологічний аналіз опіоїдергічного компоненту в анальгетичній дії DSK-38 та трамадолу проведено згідно із загальноприйнятим способом. Дослідження гострої токсичності DSK-38 проведено на нелінійних щурах та мишах з використанням табличного методу. На підставі показників $ЛД_{50}$ та ED_{50} розраховували терапевтичний індекс ($ЛД_{50}/ED_{50}$). Був використаний цілий ряд біохімічних, морфологічних та високо специфічних досліджень (*визначення стабільних метаболітів оксиду азоту, активності простагландин-Н-синтази тощо).*

Автор також наводить дані щодо використання в дослідженнях статистичних методів обробки отриманих результатів. Слід зазначити, в подальшому при обговоренні результатів, формулюванні висновків дисертант використовує тільки статистично достовірні відмінності у відповідних вибірках.

Викладення власних результатів зроблено згідно поставлених завдань та загальної мети дослідження. Так, спочатку (***розділ 3***) здобувачем наводяться результати експериментальної характеристики протизапального і знеболюючого ефектів в ряду нових похідних (3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4] триазино [2,3-с] хіназолін-6-іл) алкілкарбонових кислот та їх галогеновмісних аналогів. Встановлена сполука-лідер. Тільки ця сполука - DSK-38 характеризувалася високим рівнем спорідненості щодо ферменту ЦОГ-1, тоді як високий рівень афінності, щодо ЦОГ-2, окрім сполуки DSK-38, характерний також сполукам DSK-70, 72, 75, 127, 128, AV-218 та 226. При цьому за ступенем афінності до ЦОГ-2 сполука DSK-38 на 40 % переважала свою спорідненість до ЦОГ-1. DSK-38 (4 мг/кг) подібно до диклофенаку (8 мг/кг) проявляє антиальтеративні, антипроліферативні, репаративні та жарознижуючі властивості. За величиною показника гострої

токсичності $ЛД_{50}$ для мишей та щурів (відповідно 2240,0 та 2820,0 мг/кг, в/оч) сполука DSK-38 відноситься до практично нетоксичних речовин за класифікацією К.К. Сидорова (1973). Сполука-лідер відноситься до ненаркотичних анальгетиків, оскільки, на відміну від трамадолу, її поєднання з налоксоном не супроводжується зменшенням величини знеболюючого ефекту. Сполука DSK-38 є більш безпечною речовиною, ніж диклофенак, щодо шлунково-кишкового тракту: виразковий індекс становив відповідно 0,04 та 0,6.

В ***розділі 4*** наведена доказова база в позитивній характеристиці лікувального ефекту сполуки DSK-38 на моделях ад'ювантного артриту у щурів та експериментального стоматиту.

П'ятий розділ – це експериментальні дані щодо стану морфологічних змін *(печінка, нирки, надниркові залози, слизової оболонки шлунка, гомілковостопних суглобах)* в оцінці терапевтичної ефективності сполуки-лідера в порівняні з диклофенаком натрію в динаміці модельованого у тварин ад'ювантного артриту. На підставі патоморфологічного дослідження внутрішніх органів автор констатує відсутність локального та загального токсичного впливу сполуки DSK-38 на організм щурів з моделлю АА. Лікування експериментального артриту сполукою DSK-38 (2 мг/кг) сприяє зменшенню запального процесу в синовіальній оболонці гомілковостопних суглобів і за ефективністю не поступається диклофенаку натрію, про що свідчить наявність у даної сполуки антипроліферативних властивостей. При цьому DSK-38 виявилась більш безпечною речовиною, ніж класичний НПЗЗ, оскільки вона позбавлена ульцерогенного ефекту, не викликає, на відміну від диклофенаку, дистрофічних та деструктивних змін печінки, нирок, наднирників та слизової оболонки шлунка (СОШ).

На мій погляд як фармаколога заслуговує на особливу увагу ***розділ 6*** дисертаційної роботи, що рецензується. А саме, вплив сполуки DSK-38 на активність PGH – синтази в СОШ та на активність NOS та рівень стабільних метаболітів NO. Автором встановлено, що на тлі дії диклофенаку активність PGH - синтази в СОШ вірогідно більше ніж на третину знизилась відносно контролю, в

той час як під впливом DSK-38 активність даного ферменту практично залишалась не змінною: динаміка становила – 8,1% ($p>0,05$). Зазначені відмінності в дії DSK-38 та диклофенаку на активність PGH- синтетази можуть бути ознакою їх різної безпечності щодо СОШ, що було встановлено у попередніх дослідженнях. На підставі отриманих даних щодо визначення активності NOS та рівня стабільних метаболітів NO, можна вважати, що доведене автором збільшення під дією DSK-38 (2 мг/кг) вмісту у крові щурів стабільних метаболітів оксиду азоту, як і зростання активності сумарної NO-синтази в СОШ, згідно з відомими даними літератури є віддзеркаленням її стимулюючого впливу на продукцію NO в організмі, що сприятиме захисту СОШ завдяки здатності NO покращувати трофіку СОШ та модулювати утворення в ній слизу та бікарбонатів. Це ймовірно лежить в основі низької гастротоксичності сполуки DSK-38. Цей факт підтверджує безпечність досліджуваної сполуки, хочу подякувати дисертанту та його керівникові за ці відкриття.

Таким чином, результати роботи викладено у логічному зв'язку. Вони по тексту дисертації та в авторефераті наведені державною та на мові міжнародного спілкування і є безперечно переконливими та добре сприймаються при читанні.

В кінці розділів власних досліджень сформульовано проміжні висновки та наведено перелік публікацій, де знайшли відображення результати експериментів.

Аналіз та узагальнення результатів викладено у відповідності з послідовністю завдань роботи та окремих розділів дослідження. Ознайомлення з цим розділом дало відчуття цілісності виконаної роботи, високого наукового рівня. Автор володіє знанням сучасної наукової літератури, вміло аналізує та описує отримані результати.

Заключення та висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями розробок в цій галузі. Вони викладені лаконічно, що свідчить про відповідні досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи.

Список використаної літератури складено згідно існуючих вимог, із чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань.

8. Повнота викладання матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.

Фактичні дані, а також теоретичні узагальнення повною мірою висвітлені в опублікованих 19 наукових роботах, із яких 5 статей у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, одна - у закордонному виданні, 13 тез доповідей на наукових форумах різного рівня, 1 патент України на винахід.

Автореферат за змістом відповідає сутті дисертаційної роботи і в ньому відображено головні її положення.

9. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. Вони написані логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення, хоч і не позбавлена деяких технічних недоліків не принципового характеру (стор. 4, 22, 29, 41, 72, 91, 106, 131, 152, 178, 184, 201).

Під час офіційного захисту на нашу думку варто **обговорити наступні питання:**

1. Відомо, що в ряду НПЗЗ від неселективних до вибіркових, високо селективних інгібіторів ЦОГ-2 (коксибів) здатність впливати на агрегацію тромбоцитів змінюється від антиагрегантів *(ацетилсаліцилова кислота)* до проагрегантних тромбогенних *(еторикоксиб)*. Як Ви вважаєте, Ваша сполука-лідер DSK-38 буде виразно впливати на процес згортання крові?

2. Знижена активність NO-синтази в СОШ характерна для гіперацидних станів шлунково-кишечного тракту. Чи може сполука DSK-38, яка згідно Ваших даних володіє спроможністю відновлювати знижену активність NO-синтази, і корелює із вірогідним зростанням в крові *(в протилежність диклофенаку)* рівня стабільних метаболітів NO, бути новим, оригінальним НПЗЗ із гастропротективною дією?

3. Згідно фізико-хімічним властивостям сполуки-лідера DSK-38 чи можливо прогнозувати зручний для лікаря і, особливо, для хворого розробку в подальшому зручних різних лікарських форм нового НПЗЗ?

4. Як можна охарактеризувати в цілому *(на прикладі Ваших даних та їх аналізу)* фармакологічний профіль сполуки DSK-38, ранжоване місце в ряду відомих НПЗЗ по протизапальній, аналгезуючій та жарознижувальній діях?

10. Рекомендації щодо використання результатів дисертації на практиці.

На основі результатів дослідження автора можна виділити основний напрямок їх практичного втілення. Це стосується доцільності подальшого вивчення в якості майбутнього оригінального НПЗЗ нової сполуки – натрієвій солі 4-(3-метил-2-оксо-2Н-[1,2,4] триазино [2,3-с] хіназолін-6-іл) бутанової кислоти (DSK-38), а також визначення перспективності пошуку нових лікарських засобів серед похідних [1.2.4]–триазинонів.

11. Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота В.В.Якубовської є самостійно виконаною, завершеною роботою, в якій отримано нові науково обґрунтовані результати, які у сукупності є суттєвими для медичної практики.

Дисертація відповідає вимогам ДАК МОН України за новизною отриманих результатів, їх теоретичною та практичною значимістю, високим рівнем узагальнень і висновків, а також технічним оформленням роботи.

Висновок:

У зв'язку з викладеним, вважаю, що дисертаційна робота **Якубовської Вікторії Володимирівни** на тему ***"Експериментальне дослідження протизапального та знеболюючого ефектів похідних (3-R-2-оксо-2Н-[1,2,4]триазино[2,3-с]хіназолін-6-іл) алкілкарбонових кислот"***, повністю відповідає чинним вимогам викладеним в п. 13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння звання старшого наукового співробітника» ДАК МОН України, а дисертант заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.05. – фармакологія.

Професор кафедри фармакології і клінічної фармакології
ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України",
доктор медичних наук, професор В.Й. Мамчур

Підпис
ЗАСВІДЧУЮ
ДЗ «ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ»
«___» ____________ 20___ р.