

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Нестеркіної Марії Володимирівни

«Нові похідні терпеноїдів з протисудомною, аналгетичною та протизапальною активністю», яку подану до спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 – Біоорганічна хімія.

1. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Біль та її супутні симптоми є комплексними сигналами на різних рівнях центральної нервової системи, на кожному з яких можлива їх фармакологічна корекція та модуляція. Однією з логічних стратегій для розробки нових анальгетиків є спрямованість їх дії на самий початок больового шляху – ноцицептивні рецептори, що детектують шкідливі стимули. Група рецепторів – каналів транз'єнтного рецепторного потенціалу (transient receptor potential channels, TRP-рецептори) є однією з численних, що відповідають за різні відчуття болю. Однак, при різних патологічних станах відчуття болю може виникати навіть при відсутності шкідливого стимулу, у відповідь на нешкідливий (алодінія) стимул, або давати занадто сильну відповідь на слабкий (гіперальгезія).

Відкриття та дослідження TRP рецепторів, відкриває нові можливості для пояснення протизапальної активності цілого ряду сполук, а також дає підстави для перегляду існуючих механізмів виникнення та розвитку запального процесу. Особливу увагу приділяється в останній час ванілоїдним рецепторам 1 типу (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1), які відіграють провідну роль у багатьох патологічних процесах (біль запального характеру, нейропатичний, вісцеральний та ін.). На підставі сучасних досліджень можливо заключити, що він є важливим полімодальним рецептором, котрий інтегрує різноманітні стимули до однієї ноцицептивної відповіді. Це визначає пошук модуляторів TRPV1 рецептору як один з пріоритетних напрямків роботи науково-дослідних лабораторій по всьому світу. Як перспективний базис для створення нових модуляторів цього типу рецепторів виступають природні ліганди, зокрема, терпеноїди, модифікація яких ендogenousними біологічно активними сполуками дозволяє отримати нові

структури, для яких основні прояви фармакологічного ефекту є вже очікуваними. Інший підхід, що вже тривалий час використовується у медичній хімії для оптимізації біофармацевтичних та фізіологічних властивостей ендogenous сполук – синтез похідних, фізико-хімічні властивості яких дозволяють їм легше та ефективніше долати біологічні бар'єри та надходити до біофазы дії. Таким “носієм” виступають вищі жирні кислоти або спирти (пасивне підвищення ліпофільності та накопичення у ліпідних ділянках біомембран), субстрати систем активного транспорту (відповідно, активне транспортування химерних молекул проти градієнту концентрації) чи використання молекул, які самі здатні виступати як поліпшувачі масопереносу (макроциклічні сполуки, утворювачі пор чи, наприклад, каталізатори міжфазного переносу). З огляду на це мета дисертаційної роботи Нестеркіної М.В., яка включає синтез похідних терпеноїдів та калікс[4]арену з ГАМК та гліцином із подальшим вивченням їхньої протисудомної, анагетичної та протизапальної активності, відповідає сучасним тенденціям біоорганічної хімії та є обґрунтованим з практичної точки зору та актуальним дослідженням.

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

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт кафедри фармацевтичної хімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова «Дослідження фізико-хімічних та фармакологічних властивостей нових природних та синтетичних речовин з протизапальними властивостями» (№ держреєстрації 0112U002387) та «Молекулярні механізми зв'язування нових лігандів з анагетичною, протизапальною та нейротропною активністю з TRP, ГАМК та гліциновими рецепторами» (№ держреєстрації 0117U001102). Дисертант є співвиконавцем зазначених тем.

3. Особистий внесок здобувача

Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, аналіз наукової літератури за темою дисертації, обґрунтована схема та методичні підходи досліджень, проведено попередній прогноз біологічної активності запланованих сполук, виконано весь обсяг експериментальної частини дослідження. Постановка

мети дослідження та обговорення результатів здійснено разом з науковим керівником д.б.н., проф. І.А. Кравченко. Самостійно проведено фармакологічні дослідження, сформульовано висновки дисертації, оформлено таблиці та рисунки, проведено статистичну обробку результатів, оформлено та підготовлено дисертаційну роботу.

4. Ступінь обґрунтованості наукових положень дисертації, їх достовірність та новизна.

Після ретельного аналізу даних літератури з більш ніж 220 джерел дисертантом було чітко сформульована мета роботи та логічно побудовані завдання, які дозволили визначити об'єктом наукового дослідження низку нових похідних терпеноїдів та калікс[4]арену, здійснити їх синтез, охарактеризувати їх фізико-хімічні властивості та провести основні дослідження з оцінки їх фармакологічної активності. На першому етапі роботи автором за допомогою загальноприйнятих та добре вивчених методів синтезу отримано низку вказаних сполук – похідних з гліцином та гамма-аміномасляною кислотою. Другий етап дослідження залучав сучасні методи – ^1H -ЯМР спектроскопію, мас-спектрометрію, ІЧ- та УФ-спектроскопію для встановлення та підтвердження структури синтезованих сполук. За допомогою рентгеноструктурного аналізу була встановлена конформація сполук з хіральними центрами, а рядом фармакологічних методів досліджено аналгетичні, протизапальні та протисудомні властивості. Оскільки в рамках поставлених завдань застосовані методики є загальноприйнятими, їх застосування не потребує додаткової валідації, а отримані таким чином результати є достовірними. У роботі використано достатню кількість для достовірного аналізу лабораторних тварин (650 нелінійних мишей та 120 нелінійних щурів), а належна статистична обробка експериментальних даних дозволила зробити обґрунтовані висновки.

Наведене свідчить, що висунуті автором наукові положення є досить обґрунтованими, результати достовірні та логічно випливають з отриманого та проаналізованого експериментального матеріалу, правильно оформлені та чітко сформульовані.

5. Наукова новизна роботи

У науковому дослідженні Нестеркіної М.В. вперше здійснено синтез нових естерів нейромедіаторних амінокислот (ГАМК, гліцин) з терпенами (ментол, тимол, карвакрол, гваякол, борнеол, еugenol), для яких спрогнозовано можливість прояву протисудомної, аналгетичної та протизапальної активностей. Також вперше синтезовано похідні *n*-трет-бутилкалікс[4]арену, що містять залишки γ -аміномасляної кислоти, приєднаної до макроциклічного каркасу за рахунок амідного та естерного фрагментів.

Як безсумнівну наукову новизну роботи слід визнати отримані результати щодо біологічної активності отриманих сполук, зокрема, на фармакологічних моделях оцінки аналгетичної, протизапальної та антиконвульсивної дії. До того ж, на моделі гострих генералізованих судом продемонстровано, що отримані естери терпенів з ендogenous амінокислотами виявляють пролонговану протисудомну дію. Отримані кон'югати похідних калікс[4]арену із ГАМК досліджено *in vivo* на моделі гострих генералізованих судом.

Вперше запропоновано механізм комбінованого впливу синтезованих естерів як на ЦНС, так і на ноцицептивну систему, пов'язаний із впливом на ГАМК та TRP рецептори.

Також до нових та оригінальних отриманих наукових даних відноситься вперше запропонований механізм впливу естерів терпенів на проникність шкіри шляхом підвищення плинності ліпідів рогового шару.

Наукова новизна роботи підтверджена 1 патентом на винахід.

6. Практичне значення результатів роботи.

Найбільш суттєвими практичними результатами роботи є запропонований підхід поєднання в межах однієї молекули модуляторів TRP-каналів та сполук, що зв'язуються із гліциновими та ГАМК-рецепторами, який дозволяє у подальшому отримати низку препаратів комбінованої дії для лікування запальних процесів, зменшення больової чутливості та усунення розладів ЦНС.

У рамках цього підходу синтезовано та досліджено перспективні естери на основі монотерпенів та нейромедіаторних амінокислот (ГАМК, гліцин) з

комплексним механізмом дії, яким властива виражена аналгетична, протизапальна та протисудомна активність.

Вагомим практичним результатом є демонстрація в дисертаційній роботі того, що отримані естери, поєднуючи властивості підвищувачів проникності шкіри з власною широкою фармакологічною активністю, можуть вводитися до організму трансдермальним шляхом. Автором запропоновано механізм їх впливу на мембрани клітин рогового шару.

Результати роботи впроваджено в учбовий процес кафедри фармацевтичної хімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова та кафедри фармакогнозії та технології лікарських засобів Одеського національного медичного університету.

7. Структура роботи

Дисертаційна робота оформлена у загальноприйнятому форматі та складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та обговорення результатів досліджень, висновків та списку джерел використаної літератури.

У **вступі** автором стисло визначено та обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, стан проблеми вивчення TRP-рецепторів та окремих біологічних ефектів, які через них реалізуються, сформувано мету та завдання наукового дослідження.

Огляд джерел літератури присвячений аналізу стану проблеми вивчення TRP-рецепторів, їх характеристики та класифікації, локалізації в організмі та низці біологічних ефектів, що ними зумовлені. Наведено приклади сполук, які виступають як модулятори – природного та синтетичного походження. Приділено увагу здатності терпенів, як лігандів TRP-рецепторів, підвищувати проникність шкіри й можливим механізмам реалізації цієї дії. Також огляд літературних джерел містить дані щодо похідних калікс[4]арену, як можливих перспективних біологічно-активних сполук та допоміжних речовин (зокрема, при створенні кон'югантів з різними біологічно-активними речовинами, та як власне поліпшувачів проникності через біологічні бар'єри організму). Інформація даного

розділу висвітлює стан проблеми та обґрунтовує актуальність обраної автором теми, формування мети та завдань дослідження.

У **другому** розділі наведено дані з якості використаних реагентів, приладів, та тварин, із залученням яких було проведено біологічну частину дисертаційної роботи. Експерименти на тваринах проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях». Методи, застосовані у роботі, наведені детально, дозволяють при необхідності відтворити кожен з етапів дослідження, є загальноприйнятими та підтверджують високий практичний рівень роботи. Серед методів слід відзначити використання спектрофлуориметрії, завдяки якій отримано дані щодо плинності штучних мембран, а також методу внутрішньовенної інфузії судомних агентів, який дозволяє проводити фармакологічний аналіз з використанням швидкооборотних біологічних ефектів. Статистична обробка експериментальних результатів здійснена із використанням відомих підходів.

Третій розділ описує синтез та визначення фізико-хімічних властивостей естерів терпеноїдів та калікс[4]аренів з гальмівними амінокислотами – гліцином та ГАМК. Стратегія синтезу включала попереднє блокування аміногрупи *трет*-бутилоксикарбонільною (Boc) захисною групою з подальшою активацією дициклогексилкарбодіімідом та ацилюванням гідроксигрупи терпенів чи похідних калікс[4]аренів. Вибір такого шляху синтезу дозволив працювати в “м’яких” умовах та уникати можливих побічних реакцій. Будова сполук підтверджена результатами мас-спектрометрії, ІЧ- та ¹H ЯМР-спектроскопії, чистота продуктів контролювалась методом ТШХ у різних системах розчинників, а для встановлення чи підтвердження конфігурації хіральних сполук залучено метод рентгеноструктурного аналізу.

Результати дослідження впливу отриманих естерів терпеноїдів на структуру біологічних мембран, для чого був використаний метод мембранних зондів, наведено у **четвертому** розділі. У якості ліпідного мембранного зонду було обрано пірен, який у ліпідних бішарах локалізується на рівні вуглеводневих

залишків – це дозволяє безпосередньо оцінити плинність модельних мембран. Вплив на мікров'язкість оцінено на підставі коефіцієнтів ексімеризації пірену, а також індексу полярності, завдяки чому автором проведено аналіз можливих механізмів підвищення рухомості мембран. На думку автора основним механізмом впливу моноциклічних терпеноїдів та їхніх естерів на ліпіди мембран є зменшення мікров'язкості та, як наслідок, зменшення щільності упаковки ліпідів. У випадку із біциклічним спиртом борнеолом та його естером ймовірним було загальне збільшення полярності ліпідних мембран. В обох випадках досліджувані терпеноїди чи їхні похідні сприяли дестабілізації мембранних ліпідів, що аргументує використання даних сполук в умовах трансдермального введення.

Метод ІЧ-спектроскопії було використано з метою встановлення більш детального механізму взаємодії між молекулами фосфоліпідів та синтезованих естерів. Ці дослідження були проведені як з окремими фосфоліпідами, так й з сумішшю ліпідів рогового шару, яка у більшому ступені моделює процес взаємодії естерів терпенів при їх трансдермальному введенні.

П'ятий розділ дисертаційної роботи присвячено вивченню фармакологічних властивостей отриманих естерів – починаючи з визначення показників гострої токсичності (як при парентеральному, так й при пероральному шляхах введення) до протисудомної дії по антагонізму з коразолом (при його внутрішньовенній інфузії). Дослідження аналгетичної активності синтезованих естерів та вихідних терпеноїдів проводили на моделях термічно- (“гаряча пластина”) та хімічно-індукованого болю (субплантарне введення розчину формаліну, капсаїцину чи алілізотіоціанату) при місцевій аплікації терпеноїдів та їх естерів у вигляді 2%-ої мазі. На використаних моделях була показана значна аналгетична дія терпеноїдів та їхніх естерів із ГАМК та гліцином при трансдермальному використанні мазей із вказаними сполуками. Антиноцицептивна активність більшості естерів перевищувала дію сполуки-порівняння анестезину (у випадку ментолу, борнеолу та їхніх естерів), а також для гліцинових естерів тимолу та карвакролу.

Протизапальна дія сполук також була оцінена на моделі алілізоціанат-індукованого запалення та запропоновано, що механізм протизапальної дії терпеноїдів (та їхніх естерів) пов'язаний із блокуванням TRPA1 іонних каналів,

внаслідок чого унеможлиблюється зв'язування прозапального агенту АІТЦ з даними каналами.

Також розділ містить результати досліджень вивчення протисудомних властивостей похідних калікс[4]арену з приєднаними до них залишками С- та N-кінцевої ГАМК, а також анагетичних властивостей у тесті "гаряча пластина" та формалін-індукованій алгезії. Дослідження були проведені в декількох часових інтервалах з метою оцінки можливої пролонгованої дії досліджуваних сполук.

У шостому розділі здійснено аналіз й узагальнення експериментальних результатів дослідження та у подальшому наведено висновки, які логічно витікають з отриманих даних.

8. Повнота викладання матеріалу дисертаційної роботи у наукових публікаціях.

Наведений список наукових публікацій як загальний, так і за тематикою кожного з розділів, підтверджує повноту оприлюднення отриманих експериментальних даних та сформульованих висновків. Отримані експериментальні результати та узагальнюючі висновки, що висуваються на захист, повністю відображені у наукових виданнях та на достатній кількості конференцій.

Загалом за матеріалами дисертації опублікована 21 праця, у тому числі 1 патент на винахід, 6 статей у наукових фахових журналах та тези 14 доповідей.

Автореферат повністю відображує зміст дисертації.

9. Зауваження

Дисертаційна робота написана логічно, із дотриманням існуючих сучасних вимог відносно структури, змісту та технічного оформлення. У роботі не виявлено суттєвих недоліків, втім протягом ознайомлення виникла низка зауважень стосовно змісту та оформлення:

- Отримання активованих естерів за методом Стегліха й механізм цих реакцій є добре вивченим і відомим, та, оскільки це не було пов'язано безпосередньо з темою дисертаційної роботи, не варто було включати цей матеріал у експериментальну частину;

- Для оцінки плинності модельних мембран було використано лише пірен, що є гідрофобним зондом. Однак зміни його флуоресценції дають інформацію лише про гідрофобні ділянки бішару. Приймаючи до уваги асиметричність навіть модельних біомембран, що отримані з рогового шару, можливо, було б більш інформативним використанні інших зондів (наприклад NBD-фосфатиділетаноламін (7-нітро-2-1,3-бензоксадіазол-4-ил)-фосфатиділетаноламін), що дають змогу оцінити рухомість мембран в більш полярних областях;

- Показники гострої токсичності наведені у розмірності "мг/кг". Це може бути прийнятним для характеристики власне токсичності окремої сполуки, а для порівняльного аналізу вони мають бути наведені у молярних дозах (ммоль/кг).

До того ж, в роботі існують поодинокі невідповідності у термінах - так, вказано (стор. 118), що анестезин здатний активувати TRPV1 канали, тоді як відомо, що механізм його знеболювальної дії полягає у блокуванні натрієвих каналів, а знеболюючий ефект через TRPV канали реалізується шляхом їх блокування. Втім, вибір анестезину, як локального анестетика, є логічно обґрунтованим з точки зору порівняння сили знеболюючого ефекту.

Втім, наведені зауваження ніяким чином не знижують приємного враження від роботи, побудови плану проведення дослідження, викладання та аналізу отриманого експериментального матеріалу та вказаної наукової цінності роботи.

В процесі ознайомлення з роботою виникнули окремі **питання** стосовно вибору методів та інтерпретації отриманих результатів:

- Чому саме коразол було використано в роботі у якості хемоконвульсанта при внутрішньовенній інфузії. Відомо, що він є непрямим антагоністом ГАМК_A-рецептора, але, оскільки одним з фрагментів у низці сполук є залишок гліцину, доцільно було б використати специфічний антагоніст гліцинових рецепторів – стрихнін для отримання даних, що характеризуватимуть механізми дії даних сполук.

- На підставі показників протисудомної активності естерів терпенів на короткі проміжки часу автором було висунуто припущення про те, що вони не відносяться до класичних проліків, та мають власну активність. Ця думка є

суперечливою, оскільки пероральний шлях введення та час (1 година) допускають й гідроліз під впливом неспецифічних тканинних естераз. Чи проводились дослідження з вивчення швидкості гідролізу цих естерів в умовах *in vitro*? Та чи було визначено протисудомну активність власне вихідних терпенів, як це було цілком правильно здійснено при вивченні ГАМК-похідних калікс[4]арену (ГАМК та її метиловий естер)?

Висновок

Дисертаційна робота Нестеркіної Марії Володимирівни «Нові похідні терпеноїдів з протисудомною, аналгетичною та протизапальною активністю» є самостійною та завершеною науковою працею, що виконана на високому методичному та науковому рівні. Результатом роботи є теоретичне обґрунтування та вирішення актуального наукового завдання – створення та дослідження нових похідних терпеноїдів та калікс[4]аренів, які одночасно здатні проявляти аналгетичну, протисудомну та протизапальну активність.

За актуальністю теми, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів робота повністю відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19 серпня 2015 року), які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор, Нестеркіна Марія Володимирівна, заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Старший науковий співробітник
відділу фізико-хімічної фармакології
Фізико-хімічного інституту
ім. О.В. Богатського НАН України,
доктор біологічних наук



В.Б. Ларіонов

Підпис д.б.н. В.Б. Ларіонова засвідчую
Вчений секретар
ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України,
к.х.н., с.н.с.



 С.В. Шабанов