

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Матюшкіної Марини Володимирівни
«Фармакологічна активність нових координаційних сполук металів з лимонною
кислотою», подану до спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при
Національному фармацевтичному університеті МОЗ України на здобуття
наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю
14.03.05 – фармакологія

Актуальність теми. Перспективним напрямом пошуку нових БАР є керований синтез сполук зі спрямованою фармакологічною активністю. Під час екологічного напруження стратегічно важливим моментом у цьому плані є застосування функціональних принципів хімічної біоміметики, копіювання унікальних функцій і природних реакцій, які відбуваються в живих організмах. Тому доцільним є використання речовин, які за своєю природою близькі до ендогенних сполук, або є незамінними учасниками біохімічних процесів живого організму.

Сучасна медична наука розглядає патологічний процес як результат системних метаболічних, дизрегуляторних порушень, що розгортаються в межах мультикомпонентних систем і які загально торкаються, нейроендокринної регуляції, змін на тканинному рівні, субстратів кровоносної, лімфатичної системи. Також важливу роль при цьому відіграють біометали, які входять до складу ферментів і коферментів у вигляді координаційних сполук, контролюючи широке коло реакцій енергетичного і пластичного забезпечення.

Відомо, що грип та гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) становлять 95 % усіх інфекційних захворювань у світі. Однак грип, на відміну від інших ГРВІ, має більш важкий перебіг з розвитком ускладнень, які можуть призводити до летального результату. Незважаючи на успіхи, досягнуті в галузі хіміотерапії та вакцинопрофілактики грипу, він залишається важко контрольованою інфекцією внаслідок високої генетичної мінливості і різних довготривалих ускладнень після гострої стадії хвороби.

Неухильне зростання захворювань нейроінфекційної природи обумовлює пошук нових нейротропних лікарських засобів, оскільки сучасні препарати не завжди відповідають існуючим вимогам. У структурі загальної патології нервової системи близько 40 % займають нейроінфекції, актуальність яких визначається високим відсотком захворюваності у осіб працездатного і фертильного віку. Дана ситуація пов'язана з розширенням спектру етіопатогенів, збільшенням змішаних і атипичних форм, зростанням резистентності та зниженням ефективності основних груп антибактеріальних засобів на тлі їх нераціонального застосування, збільшенням числа осіб з первинним і вторинним імунodefіцитом у популяціях, тощо. З цього виникає необхідність пошуку таких лікарських засобів, які могли б одночасно впливати на етіологічні фактори нейроінфекційного процесу та попереджати і ліквідувати його неврологічні ускладнення.

Вище наведене обумовлює доцільність вивчення і впровадження в клінічну практику відносно нешкідливих препаратів з високою біологічною активністю та залишається актуальною задачею фармакології.

Зв'язок теми дисертації з науковими державними та галузевими програмами і планами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри загальної та клінічної фармакології Одеського національного медичного університету (ОНМедУ) МОЗ України за темою: «Пошук і комплексне вивчення фармакологічного профілю нових біологічно активних речовин метаболічного походження і ксенобіотиків» (номер держреєстрації 0110U006658). Дисертант є співвиконавцем даної теми.

Характеристика змісту роботи. Дисертацію викладено за традиційною схемою, на 161 сторінці основного тексту. Робота містить анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів досліджень (розділ 2), три розділи власних досліджень (розділ 3-5), аналіз та узагальнення результатів, висновки, список використаної літератури і додатки. Робота проілюстрована 38 рисунками та 45 таблицями. Перелік використаних джерел містить 380, з яких 237 найменувань – кирилицею, 143 – латиницею.

Анотація до дисертаційної роботи оформлена згідно з вимогами наказу № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

У **вступі** обґрунтовано актуальність проблеми, визначені мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження, сформульовано наукову новизну та практичне значення роботи, визначено особистий внесок автора, наведені дані про апробацію отриманих результатів.

В **огляді літератури** (розділ 1), який складається з семи підрозділів, викладені переваги та сучасні аспекти фармакології металокомплексів та зазначена доцільність моделювання нових біологічно активних речовин (БАР) на основі біометалів та природних метаболітів. Вказана перевага комплексного залучання до складу лікарських засобів металокомплексів з органічними кислотами. Також зроблено наголос на актуальність пошуку антимікробних та противірусних засобів серед координаційних сполук біометалів. Далі дисертант зупиняється окремо на фармакологічній активності сполук Германію, Магнію, Стануму та Кобальту та їх практичному застосуванні у медицині.

У **другому розділі** наведені дизайн дослідження і характеристика методів, які були застосовані автором для досягнення поставленої мети.

Дослідження були проведені на 154 білих мишах лінії ISR та 2068 статевозрілих щурах лінії Вістар, які утримувалися згідно з прийнятими біоетичними нормами та дотримання принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та Законом України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р. зі змінами. Дотримання біоетичних норм засвідчено висновками комісії з біоетики ОНМедУ на етапі планування (протокол № 46-6 від 20.09.2013 р.) та по закінченню роботи (протокол № 120-Є від 06.10.2017 р.)

У роботі були використані такі методи: токсикологічні (гостра, підгостра, протягом 3 міс токсичність), фармакологічні і патофізіологічні (тест «відкрите поле» - рухова активність на інтактних щурах та при взаємодії з депримуєчим та збуджуючим препаратами; тривалість тіопенталового сну; моделі агресивно-

захисної поведінки і конфліктної ситуації; апоморфін-стеоретипна поведінка; модель умовної реакції активного уникнення; тести «стрижня, що обертається» та «підведеної під кутом 80° сітки»; моделі гострих генералізованих судом, викликаних пентелентетразолом, пікротоксином, каїновою кислотою, пілокарпіном); загально клінічні та біохімічні; мікробіологічні (*in vitro* чутливість трьох штамів *Staphylococcus aureus*, взаємодія з бензилпеніциліном) та вірусологічні (*in vitro* активність відносно вірусу грипу людини штамів А/Гонконг/1/68 (H3N2) та А/PR/8/34 (H1N1), птахів H5N3). Результати фармакологічної активності були підтверджені гістологічно. Матеріали досліджень оброблені сучасними статистичними методами аналізу за допомогою параметричних та непараметричних тестів Крускал-Валлісу та Манна-Уїтні.

У **третьому розділі** дисертації на початку описані фізико-хімічні властивості досліджуваних БАР, які місять по два метали та біоліганд – (Mg, Co) біс (цитрато) германати (станати) – Германій та Магній з лимонною кислотою – гермацит, Германій та Кобальт лимонною кислотою – геркоцит, Станум та Магній з лимонною кислотою – станмацит, Станум та Кобальт з лимонною кислотою – станкоцит. На підставі сукупності результатів елементного та рентгенофазного аналізів, термогравіметрії, інфрачервоної спектроскопії та рентгеноструктурного аналізу визначено будову синтезованих комплексів, їх молярна маса. Встановлено, що магнійвмісні сполуки – білі, кобальтвмісні – рожеві порошки. Всі БАР негігроскопічні, розчиняються у воді, практично не розчиняються в інших органічних розчинниках; термостабільні, стійкі при збереженні в порошок та розчині. Ці дані мають важливе значення для визначення фармакологічної активності та вибору в подальшому можливої лікарської форми.

В цьому розділі також наведені результати вивчення нешкідливості нових БАР, а саме гостра токсичність та при повторних уведеннях. За даними гострого експерименту на щурах і мишах при пероральному та внутрішньоочеревинному введенні зазначено, що досліджувані БАР відносяться до малотоксичних сполук, не становлять реальної загрози виникнення та розвитку смертельного отруєння для тварин і перспективні для їх подальшого доклінічного вивчення. Дані гострої

токсичності знайшли підтвердження при вивченні морфологічних змін органів тварин при повторному застосуванні нових БАР. Дослідження координаційних сполук у щурів протягом 28 діб та 3 місяців у трьох дозах. Встановило, що одержані результати вивчення підгострої і субхронічної токсичності підтверджують низьку токсичність БАР, оскільки при введенні досліджуваних доз ($1/110$ - $1/135$ LD_{50}) не виявлено будь-якого значного токсичного ефекту на загальноклінічні та біохімічні показники крові та сечі у експериментальних тварин. Тільки введення координаційних сполук металів у великих дозах ($1/40$ LD_{50}) при тривалому введенні відрізнялося дисциркуляторними змінами в органах щурів. Більш виразні зміни в органах щурів спричиняли кобальтвмісні сполуки, а найбільш чутливою була печінка, незалежно від складу сполук.

Четвертий розділ присвячений результатам вивчення нейротропної активності нових сполук. Було досліджено вплив БАР на рухову активність у щурів в тесті «відкрите поле» та встановлено, що БАР дозозалежно ($1/80 > 1/110$ LD_{50}) мали депримуєчий вплив на ЦНС. Найбільш виразним за дією був станмацит, найменш – гермацит.

Для встановлення механізму дії сполук вивчали сумісні введення БАР з відомими фармакологічними аналізаторами (амфетаміном, діазепамом і тіопенталом). Виявлено, що всі сполуки мали антагоністичну ($1/135 > 1/110$ LD_{50}) дію до адрено- і дофаміноміметика амфетаміну, при чому заміна германію на станум привела до більш виразного ефекту (станкоцит \approx станмацит $>$ геркоцит $>$ гермацит). Також протягом 6 год в динаміці встановлено, що досліджувані БАР дозозалежним чином посилювали діазепам-спричинене пригніченням рухової активності, що свідчило про протитривожні властивості даних сполук та їх ГАМК-міметичну активність. Найбільш активним в цьому плані був гермацит, а найменш – станкоцит. Вплив БАР на виразність тіопенталового сну довів, що (Mg, Co) біс (цитрато) германати (станати) не мали власної гіпнотичної дії, проте потенціювали та пролонгували тіопенталовий сон. Це також підтверджувало ГАМК-міметичну активність досліджуваних сполук. При цьому найбільш виразну дію спричиняли германати.

В наступній серії дослідів дисертант вивчав вплив координаційних сполук на агресивно-захисну поведінку (АЗП) щурів. Отримані результати свідчили про те, що синтезовані БАР по-різному змінювали вираженість агресивної поведінки щурів в тесті АЗП. Германати виявляли достовірні антиагресивні властивості. Найбільш цікавим в цьому плані був геркоцит, який проявив значний антиагресивний ефект протягом 6 год експерименту незалежно від дози. Найменшу активність виявив – гермацит. Проте станати зі збільшенням дози (1/80 LD₅₀) спричиняли проагресивний ефект. В тесті конфліктної ситуації всі БАР в тій чи іншій мірі мали протитривожну і седативну дію, що проявлялося нормалізацією поведінки щурів в камері під впливом больового подразника, усуненням проявів «невротизації» тварин, появою цілеспрямованості в їх діях, проте геркоцит був найбільш активним. Необхідно відмітити, що автор не тільки констатує отримані результати дослідження, але і пояснює причини виникнення виявлених ефектів досліджуваних сполук ймовірними механізмами дії. Встановлений депримуєчий вплив даних БАР на рухову активність тварин, їх різноплановий антагоністично-синергічний характер взаємодії зі збуджуючими та депримуєчими нейротропними засобами, а також відомі нейрофізіологічні механізми розвитку агресивно-захисної поведінки, дисертант припускає, що германати впливають переважно на ГАМК-ергічну, а станати – на інші нейромедіаторні системи (дофаміно-, адрено- та серотонінергічні).

Результати проведених М.В.Матюшкіної досліджень свідчать про те, що нові сполуки також по-різному, залежно від складу та дози, впливають на процес вироблення умовної реакції активного уникнення (УРАУ) і вираженість мнестичних функцій тварин. Слід зазначити досить високу ноотропну ефективність геркоциту, яка перевищувала або була співставною з такою референс-препарату аміналону в діапазоні доз (1/135-1/80 LD₅₀) і виражалася покращенням формування умовного рефлексу та пам'яті. Станати меншими дозами покращували тільки навчання та короткострокову пам'ять щурів на рівні аміналону; зі збільшенням дози спостерігалось погіршення формування умовного рефлексу і довгострокової пам'яті. Встановлену різницю у впливах германатів та станатів на вищі інтегративні

функції щурів автор пояснює особливостями механізмів розвитку їх нейротропних ефектів.

Особливості нейротропної активності станум- і германійвмісних сполук вивчали впливом на стереотипну поведінку, викликану введенням дофаміноміметика апоморфіну гідрохлориду. Пригнічували дофамінергічну нейропередачу станумвмісні сполуки (станкоцит, станмацит), а германати практично не впливали на цей тест. Це ще раз свідчило на користь того, що станати реалізують свій депримуєчий нейротропний ефект через переважно блокуючий вплив на дофаміно-та адренергічну нейропередачу.

Отримані дисертантом результати у тестах «стрижня, що обертається» та «підведеної сітки» свідчали про те, що м'язовий тонус і координація рухів щурів змінювалися під впливом усіх досліджуваних БАР. Проте автор відмітив, що заміна германію на станум призводить до збільшення впливу на м'язовий тонус і координацію рухів щурів. Найбільш виразний міорелаксантийний ефект виявився при введенні станмациту у всіх досліджуваних дозах.

Наступною частиною дослідів було визначення впливу координаційних сполук на перебіг гострих судомних реакцій, індукованих конвульсантами з різними механізмами судомної дії. Автор констатує, що досліджувані БАР модифікували вираженість та інтенсивність гострих генералізованих судом, індукованих пентилентетразолом, пікротоксином та каїновою кислотою. Проте БАР не впливали на характер пілокарпін-індукованих судом. Взагалі за протисудомною дією найбільш активними виявилися германати. Виявлені особливості впливу досліджуваних сполук на гостру судомну активність, викликану різними конвульсантами, сприяла з'ясуванню механізмів нейротропної дії нових БАР.

У **п'ятому розділі** дана оцінка антибактеріальної та противірусної активності синтезованих сполук. В дослідях *in vitro* була вивчена антистафілакокова дія 4-х нових БАР в ряду (Mg, Co) біс(цитрато) германатів (станатів) та виявлена їх мінімальна інгібуюча концентрація. За результатами, які отримав дисертант, найбільш виразну антистафілакокову активність мали кобальтвмісні сполуки (геркоцит і станкоцит) у концентрації 1000 мг/мл. Причому геркоцит був більш ефекти-

вним, ніж станкоцит, інгібував ріст чутливих і помірно резистентних до антибіотиків штамів *Staphylococcus aureus*. Мультирезистентний до антибіотиків штам *S. aureus* Кунда був однаково чутливим до обох сполук. Перспективність кобальтвмісних БАР, і перш за все геркоциту, як антибактеріальних сполук підтверджена не тільки встановленою власною антимікробною активністю, но проведеною дисертантом серією експериментів щодо потенцювання дії бензилпеніциліну.

Другий підрозділ 5 розділу дисертаційної роботи присвячений оцінці противірусної активності досліджуваних сполук, яка була вивчена на 3-х видах клітинних культур інфузорії *Colpoda steinii*, культурі клітин хоріон-алантоїсних оболонок (ХАО) та культурі клітин нирки собаки Майдін Дербі (MDCK) з використанням 3-х штамів вірусу грипу (людини А/Гонконг/1/68 (H3N2) та А/PR/8/34 (H1N1), птахів H5N3). Встановлено, що кобальтвмісні БАР, на відміну від магнійвмісних, мали суттєву протигрипозну активність на культурах тканини ХАО і MDCK. Заміна станум на германій у складі сполук змінювала ефективність речовин. Геркоцит більш ефективно пригнічував репродукцію вірусів грипу людини штамів А/Гонконг/1/68 (H3N2) та А/PR/8/34 (H1N1), а станкоцит – вірусу грипу птахів H5N3. За цією активністю сполуки перевищували або були на рівні референс-препарату озельтамівір.

Аналіз та узагальнення результатів викладено відповідно до послідовності завдань роботи та розділів власних досліджень.

Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають оснвні напрями в цій галузі. Вони викладені логічно, що свідчить про досягнення поставлених завдань та мети роботи.

З огляду на прорецензований матеріал можна зазначити, що мета дисертаційної роботи досягнута, а завдання досліджень виконано повною мірою. Отже, дисертаційну роботу можна вважати завершеною. Робота виконана на сучасному науково-методичному рівні і заслуговує позитивної оцінки.

Список використаних джерел оформлений згідно чинних вимог, містить 380 джерел, з яких 237 найменувань – кирилицею, 143 – латиницею.

Наукова новизна результатів полягає в тому, що вперше встановлено нешкідливість і фармакологічна активність 4-х нових сполук синтезованого класу БАР – (Mg, Co) біс(цитрато)германатів (станатів). Виявлений спектр їх нейротропних ефектів (анксиолітичні, антиагресивні, седативні, ноотропні, міорелаксанти) та визначена найбільш перспективна сполука (Co) біс(цитрато) германат (геркоцит). Вперше виявлені особливості впливу даних сполук на гостру генералізовану судомну активність тварин за умов застосування, різних за механізмом дії, конвульсантів. Встановлено, що механізм дії германатів, ймовірно, пов'язаний з ГАМК-міметичним ефектом, а у станатів – із залученням катехоламінергічних нейромедіаторних систем.

Вперше виявлено, що кобальтвмісні сполуки (геркоцит і станкоцит) мали виразну антистафілококову активність на ріст штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (чутливого) і 2781 (помірно стійкого), *S. aureus* Кунда (мультирезистентного), а також протигрипозні властивості відносно вірусу грипу людини штамів А/Гонконг/1/68 (H3N2) та А/PR/8/34 (H1N1), птахів H5N3.

Отримані дані захищені 1 патентом України на винахід та 2 патентами України на корисну модель.

Практичне значення результатів роботи. Результати даного дослідження будуть рекомендовані для подальшого вивчення перспективної речовини геркоцит для комплексного лікування і профілактики ускладнень нейроінфекцій мікробної та вірусної етіології. Отримані дані розширюють наші уявлення про біологічну активність похідних Стануму, Германію, Магнію, Кобальту, обґрунтовують доцільність їх практичного застосування та сприяють синтезу в цьому ряду нових комплексонів із певною фармакологічною дією.

Матеріали роботи впроваджено в науково-дослідницьку діяльність 8 вищих навчальних закладів України.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації. Наукові положення дисертаційної роботи Матюшкіної М.В. мають достатній рівень обґрунтованості й достовірності, оскільки базуються на сучасних, адекватних та інформативних методах та моде-

лях досліджень, мають достатню кількість спостережень та коректну статистичну обробку результатів. Результати вдало представлені таблицями та ілюстровані рисунками.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях і в авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 29 наукових праць, з них 11 статей (в тому числі 5 – одноосібні), з яких 6 опубліковано у фахових вітчизняних виданнях рекомендованих МОН України, 4 у зарубіжних індексованих виданнях, 15 тез доповідей. Отримано 1 патент України на винахід та 2 патенти України на корисну модель. Публікації віддзеркалюють основні положення роботи. Автореферат відповідає структурі та змісту дисертації.

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісту й оформлення. Дисертація та автореферат викладені українською мовою з дотриманням наукового стилю. Їх оформлення в цілому відповідає сучасним вимогам МОН України, щодо викладення, об'єму, структури, посилань на джерела літератури.

Зауваження. Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. Написані вони логічно, з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення, хоча робота і не позбавлена деяких непорозумінь не принципового характеру.

1. Зустрічаються помилки, невдалі вислови.
2. Доречно було б скоротити стару літературу та посилатися на більш сучасну: з 380 джерел - 98 є 20 річної давнини.
3. Для кандидатської дисертаційної роботи вивчення 4 нових сполук це дуже великий об'єм досліджень, достатньо було б вивчити властивості двох нових БАР.

Запитання. У порядку дискусії бажано було б почути відповіді на наступні запитання:

1. Для чого Ви вивчали протисудомну активність у дозах 1/40-1/20 LD₅₀, які, за даними проведених Вами морфологічних досліджень, є токсичними?
2. Фармакологічний ефект аміналона – референс – препарату проявляється на 25-30 добу експерименту. Протягом якого часу вводили координаційні сполуки, щоб ефект був співставлений за ефектом з препаратом порівняння?

3. Чому для вивчення антимікробної активності нових сполук Ви використали саме метод серійних розведень в рідкому середовищі Мюлера-Хінтона?

Рекомендації щодо використання матеріалів дисертації у практиці.

Проведені автором експериментальні дослідження дозволяють рекомендувати до подальших доклінічних випробувань новий БАР – (Со)біс(цитрато)германат (геркоцит) з метою розробки на її основі ефективного лікарського препарату для комплексного лікування і профілактики ускладнень нейроінфекцій, а також проведення досліджень інших фармакологічних властивостей представників синтезованого класу сполук — (Mg, Со) біс(цитрато)германатів (станатів). Результати дисертації можуть бути використані у науково-дослідницькому та науково-педагогічному процесах.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Матюшкіної Марини Володимирівни за темою «Фармакологічна активність нових координаційних сполук металів з лимонною кислотою» є самостійною, завершеною науково-дослідною працею. За своєю актуальністю науковою новизною отриманих результатів, теоретичною і практичною цінністю повністю відповідає чинним вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент
завідувач кафедри фізіології та анатомії людини
Національного фармацевтичного університету
МОЗ України,
доктор біологічних наук, професор

Л.М. Малоштан

Підпис професора Л.М. Малоштан засвідчує
Начальник відділу кадрів

З.Ф.Подстрелова

