

ВІДГУК

офіційного опонента доктора фармацевтичних наук, професора, завідувача кафедри медичної та біоорганічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ України Сирової Ганни Олегівни на дисертаційну роботу Мацькевич Катерини Володимирівни на тему «Експериментальне дослідження фосфорильованих похідних оксазолу як потенційних антигіпертензивних засобів», подану до спеціалізованої Вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті МОЗ України для захисту на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія

Актуальність обраної теми.

Дисертаційна робота Мацькевич К. В. присвячена новому вирішенню актуального наукового завдання фармакології, спрямованого на експериментальне обґрунтування доцільності розробки ефективних та безпечних лікарських засобів з антигіпертензивними властивостями на основі фосфорильованих похідних оксазолу.

Актуальність теми зумовлена даними ВООЗ, згідно яких перше місце серед найбільш поширених хронічних захворювань серцево-судинної системи займає артеріальна гіпертензія (АГ), яка вразила 1,1 мільярд людей у світі. Україна посідає перше місце серед країн Європи за смертністю населення від АГ, а частка хворих на дану патологію складає близько третини населення.

Незважаючи на наявність значної кількості зареєстрованих на фармацевтичному ринку України антигіпертензивних лікарських препаратів, більше ніж у половини пацієнтів не вдається досягти цільових значень артеріального тиску (АТ), що призводить до розвитку ускладнень, інвалідизації, зменшення якості життя, втрати працездатності та смертності. Тривале застосування полікомпонентних схем антигіпертензивної

фармакотерапії зумовлює розвиток побічних ефектів та резистентних форм АГ.

Тому, проблема пошуку нових нетоксичних антигіпертензивних лікарських засобів із широким терапевтичним індексом, які були б здатними знижувати АТ до цільового рівня, залишається невирішеною.

Враховуючи увагу дослідників до нових фармакологічно активних фосфорильованих похідних оксазолу, синтезованих вітчизняними вченими відділу хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України під керівництвом завідувача відділу професора В. С. Броварця, та відсутність попередніх фармакологічних досліджень їхньої антигіпертензивної дії, актуальним та перспективним є вивчення даного ряду сполук за умов експериментальної АГ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота виконана в рамках планових науково-дослідних робіт кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Пошук та вивчення механізмів дії нових потенційних кардіопротекторних та антигіпертензивних сполук», державний реєстраційний номер 0118U003693; «Вивчення механізмів ушкодження міокарду при експериментальній кардіоміопатії та її корекції новими координаційними сполуками германію та сполуками метаболітної дії», державний реєстраційний номер 0115U000701. Дисертант є співвиконавцем зазначених тем.

Наукова новизна отриманих результатів.

У дисертаційній роботі вперше встановлена вазодилатаційна активність ряду оригінальних фосфорильованих похідних оксазолу *in vitro* на ізольованих кільцевих сегментах аорти щурів, яка проявляється як окремо, так і при одночасній перфузії з блокатором повільних потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу, верапамілом.

Отримані наукові дані щодо токсикологічних властивостей фосфорильованих похідних оксазолу, зокрема сполуки-лідера ОВП-1. Доведено, що похідне 1,3-оксазол-4-іл-фосфонової кислоти відноситься до V класу токсичності «практично нетоксичні сполуки» при внутрішньошлунковому (в/шл) введенні та до VI класу токсичності «відносно нешкідливі сполуки» при внутрішньоочеревинному (в/о) введенні. За умови тривалого застосування ОВП-1 протягом 6 місяців визначено відсутність його токсичного впливу на зовнішній вигляд, фізіологічний стан, поведінку, масу тіла та внутрішніх органів, показники функціонального стану печінки та серця.

Встановлені наукові дані щодо впливу похідного оксазолу на функціональні показники серцево-судинної системи у наркотизованих кролів при моделюванні гострої АГ, зокрема зниження середнього артеріального тиску ($AT_{сер}$), що може бути опосередковано зменшенням загального периферичного опору судин (ЗПОС) та робочого індексу лівого шлуночка (РІЛШ) під дією ОВП-1. Експериментально доведена ефективність антигіпертензивної дії ОВП-1 на фоні сформованої стійкої АГ, викликаній сольовим питтям, та при її формуванні у щурів з метою попередження розвитку даної патології.

Встановлені механізми антигіпертензивної дії похідного оксазолу через вплив на систему оксиду азоту, так і на активність фосфодіестерази (ФДЕ), вміст іонів кальцію та жирнокислотний (ЖК) спектр ліпідів.

Практичне значення отриманих результатів.

Отримані в дисертаційній роботі результати мають практичне значення. Експериментально обґрунтовано доцільність розробки нового класу ефективних та безпечних лікарських засобів з антигіпертензивними властивостями на основі фосфорильованих похідних оксазолу.

Практичне значення результатів дослідження підтверджується трьома патентами України на корисну модель. Результати дослідження входять до Переліку наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для

впровадження в сферу охорони здоров'я (реєстраційний номер повідомлення №476/3/16, Випуск 3, 2017, С.415; №480/3/16, Випуск 3, 2017, С.418-419).

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджені в науково-дослідну роботу Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол №3 від 05.04.2019 р.), Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол №3 від 02.04.2019 р.), Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України (від 04.04.2019 р.), Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол №4 від 03.04.2019 р.).

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

Дисертаційна робота Мацькевич Катерини Володимирівни на тему «Експериментальне дослідження фосфорильованих похідних оксазолу як потенційних антигіпертензивних засобів» виконана на сучасному науковому рівні з використанням адекватних методів дослідження, достатньої кількості лабораторних тварин. Результати дисертації цілком переконливі, їх достовірність не викликає сумнівів.

Наукові положення та висновки дисертації є обґрунтованими та узгодженими з метою та завданнями дослідження.

Матеріал, наведений у дисертаційній роботі Мацькевич Катерини Володимирівни, є новим як з наукової точки зору, так і перспективним для впровадження у практичну медицину та фармацію.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих роботах і в авторефераті.

За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову працю: 8 статей, серед яких 5 – у наукових профільних виданнях, рекомендованих МОН України, 3 – у зарубіжних наукових виданнях, 2 з них у виданнях Scopus, 3 патенти України на корисну модель, 10 тез доповідей. Вважаю, що

опубліковані результати достатньо повно відображають зміст дисертаційної роботи.

Автореферат дисертації написаний змістовно, грамотно і чітко, як за структурою, так і за змістом, відповідає основним положенням роботи.

Оцінка змісту дисертації та її оформлення

Обсяг та структура дисертації. Робота містить усі необхідні розділи: анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, 4 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки, додатки та список використаних джерел в кількості 189 літературних посилань, з яких 68 – кирилицею та 121 – латиницею. Робота проілюстрована 34 таблицями та 12 рисунками.

Основний зміст дисертації та його оцінка

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

У вступі викладено актуальність наукового напрямку, мета та завдання дослідження, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, наведено особистий внесок здобувача у виконанні дисертаційної роботи, перераховано наукові заходи, де проведена апробація результатів роботи, зазначено кількість публікацій за матеріалами дисертації, її структура та обсяг.

У першому розділі дисертантом проведений огляд літератури відносно сучасного стану поширеності АГ та проблеми недостатньо ефективної фармакотерапії даного захворювання. Автором описано побічної дії та недоліки сучасних 5-ти основних класів антигіпертензивних лікарських засобів. Представлено сучасний стан дослідження нових біологічно активних сполук з судинорозширювальною активністю; показана перспективність вибору фосфорильованих похідних оксазолу в якості потенційних антигіпертензивних засобів.

У другому розділі – «Матеріали та методи дослідження» стисло, лаконічно та досить інформативно описано методи, за якими визначали досліджувані показники, наведено хімічні формули фосфорильованих похідних оксазолу. Досліди проведено на 327 статевозрілих щурах, 42 статевозрілих кролях породи Шиншила, на 106 білих нелінійних мишах. Тварин утримували на звичайному збалансованому харчовому раціоні і вільному доступі до води в умовах віварію Національного медичного університету (НМУ) імені О. О. Богомольця. Дотримання біоетичних норм засвідчене висновком Комісії з біоетики НМУ імені О. О. Богомольця (протокол від 18.01.2019 №118).

Матеріали, моделі та методи, використані в роботі, дозволяють об'єктивно та комплексно вирішити її завдання та досягти поставленої мети.

Розділ третій присвячений скринінговим дослідженням наявності вазодилатаційних властивостей на ізольованих сегментах нисхідної частини грудної аорти щурів ряду фосфорильованих похідних оксазолу ОВП-1 – ОВП-10. Встановлено, що сполукою-лідером була виявлена ОВП-1, яка в концентраціях $1 \cdot 10^{-6}$ М та $1 \cdot 10^{-5}$ М найбільшою мірою знижувала амплітуду сили скорочення, ініційованого адреналіном в концентрації $5 \cdot 10^{-6}$ М, відповідно на 12,1 % ($P < 0,05$) та 30,9 % ($P < 0,05$) відносно вихідного рівня. Вазодилатаційна активність ОВП-1 проявлялася як окремо, так і при одночасній перфузії з блокатором повільних потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу, верапамілом ($1 \cdot 10^{-5}$ М). Збереження вазодилатаційної активності верапамілу в присутності ОВП-1 дало підстави припустити, що судинорозширювальний ефект досліджуваного похідного оксазолу реалізується не через блокаду повільних потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу, а завдяки іншим механізмам.

При більш детальному дослідженні вазодилатаційної активності ОВП-1 на ізольованих сегментах аорти щурів було виявлено збереження судинорозширювальної дії ОВП-1 ($1 \cdot 10^{-5}$ М) на фоні блокатора NO-синтази L-NAME ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Сила амплітуди ініційованого адреналіном скорочення

сегменту аорти за умови присутності в перфузаті досліджуваної сполуки та L-NAME була нижчою на 19,2 % порівняно з аналогічною величиною за умов присутності в перфузаті лише L-NAME. Проте ефективність судинорозширювальної активності під впливом досліджуваної сполуки при наявності в перфузаті L-NAME була нижчою на 54 % ($4,62 \pm 0,38$ мН) порівняно з даними, виявленими за таких же умов без участі в перфузаті L-NAME ($3,00 \pm 0,39$ мН), що може свідчити про можливість впливу даної сполуки на синтез оксиду азоту (NO) та активність NO-синтази (NOS).

Розділ четвертий присвячений безпечності сполуки-лідера ОВП-1. За умов дослідження гострої токсичності похідного 1,3-оксазол-4-іл-фосфонової кислоти встановлено, що LD_{50} ОВП-1 при в/шл введенні мишам обох статей становить понад 5000 мг/кг, тому похідне оксазолу було віднесено до V класу токсичності «практично нетоксичні сполуки». Водночас LD_{50} ОВП-1 при в/о введенні становить $3350,67 \pm 54,62$ мг/кг, що дозволяє віднести похідне оксазолу до VI класу токсичності «відносно нешкідливі сполуки».

При дослідженні хронічної токсичності під час застосування ОВП-1 протягом 6-ти місяців визначено відсутність його токсичного впливу при пероральному разовому щоденному введенні щурам в дозах 5 мг/кг, 50 мг/кг та 500 мг/кг на зовнішній вигляд, фізіологічний стан, поведінку, масу тіла та внутрішніх органів, показники функціонального стану печінки та серця, білкового, вуглеводного та ліпідного обміну, а також гематологічні показники крові. Відзначена відсутність статистично достовірних змін АТ щурів, які отримували ОВП-1 в дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг протягом шести місяців відносно вихідного рівня. Проте при щоденному введенні ОВП-1 в дозі 500 мг/кг АТ зменшувався на 16,9 % ($P < 0,05$) на першому місяці, на 14,9 % ($P < 0,05$) на третьому місяці та на 15,9 % ($P < 0,05$) на шостому місяці відносно вихідного рівня.

Отже, за результатами дослідження гострої та хронічної токсичності *in vivo* ОВП-1 можна вважати безпечною сполукою при пероральному, в/шл

та в/о шляхах введення для її подальшого поглибленого вивчення за умов модельованих патологій АГ.

П'ятий розділ присвячений дослідженню антигіпертензивної дії ОВП-1 на моделях гострої та стійкої АГ. На першому етапі визначали вплив ОВП-1 на АТ, серцевий ритм та параметри загальної гемодинаміки на моделі гострої АГ, ініційованої адреналіном у наркотизованих кролів. В подальшому дослідження антигіпертензивного ефекту ОВП-1 було проведене на сольовій моделі стійкої АГ, як однієї з найбільш оптимальних для відтворення есенціальної АГ у ненаркотизованих щурів із застосуванням різних схем в/о введення досліджуваної сполуки.

ОВП-1 в дозах 1 мг/кг, 5 мг/кг та 25 мг/кг при внутрішньовенному (в/в) введенні не викликав статистично достовірних змін $АТ_{сер}$, проте в дозі 50 мг/кг знижував $АТ_{сер}$ на 28,8 % ($P < 0,05$) порівняно з вихідним рівнем.

Критерій ефективності за зниженням АТ був досягнутий при моделюванні гострої АГ на фоні похідного 1,3-оксазол-4-іл-фосфонової кислоти в дозах 25 мг/кг та 50 мг/кг, що відповідає ED_{50} досліджуваної сполуки за даних умов введення $24,19 \pm 2,98$ мг/кг (ДІ 95%: $23,09 \div 25,29$ мг/кг).

Максимальне зниження частоти серцевих скорочень ЧСС встановлено при в/в введенні ОВП-1 в дозі 50 мг/кг на 25,59% ($P < 0,05$) у наркотизованих тварин та при наступному моделюванні гострої АГ - на 13,14 % ($P < 0,05$) порівняно з інтактними значеннями.

Встановлено, що антигіпертензивний ефект ОВП-1 в дозі 25 мг/кг (ED_{50}) на моделі гострої АГ може бути спричинений його впливом на зниження систолічного артеріального тиску (САТ) на 32,7 % ($P < 0,05$), ЗПОС – 40,9 % ($P < 0,05$) відносно вихідного рівня та РІЛШ на 58,3 % ($P < 0,05$) відносно контрольної групи після введення адреналіну.

При в/о однократному введенні протягом 7 діб щурам із сформованою стійкою АГ похідне 1,3-оксазол-4-іл-фосфонової кислоти у дозі 25 мг/кг мало виражену антигіпертензивну дію. Латентний період дії досліджуваної

сполуки становив приблизно 1 год. На першу добу після введення ОВП-1 АТ знижувався на 27,0 % ($P < 0,05$), а на 7 добу – на 19,4 % ($P < 0,05$) відносно даних, що зареєстровані у тварин з АГ. Водночас діурез збільшувався на 110,8 % ($P < 0,05$) на 1-шу добу та на 75,8% ($P < 0,05$) на 7-му добу порівняно з відповідним значенням до початку введення сполуки, чого не виявлено у групах щурів, яким вводили препарати порівняння амлодипін 1,5 мг/кг та небіволол 10 мг/кг.

Антигіпертензивний ефект похідного оксазолу був співставний з ефектом амлодипіну та небівололу, проте ОВП-1, на відміну від амлодипіну, є нетоксичною сполукою та не знижує ЧСС, на відміну від небівололу, в умовах моделювання АГ шляхом сольового навантаження.

При збереженні сольового навантаження досліджувана сполука попереджала формування АГ. ОВП-1 за курсового (7 діб) введення на фоні підвищеного АТ проявляла антигіпертензивну дію та нормалізувала ЧСС. Антигіпертензивний ефект ОВП-1 за даного режиму введення був співставним з небівололом.

У **шостому розділі** дисертант викладає результати дослідження можливих механізмів дії ОВП-1 і показує, що ОВП-1 ефективно інгібує активність індукцибельної NO-синтази (iNOS) та збільшує активність ендотеліальної NO-синтази (eNOS), а також вміст нітрит-іонів (NO_2^-) в досліджених аорті, серці та сироватці крові. Найбільший ефект ОВП-1 проявляв в дозі 50 мг/кг, зокрема активність eNOS в аорті, вміст нітрит-іонів у всіх досліджуваних об'єктах практично відновлювалися до відповідних значень в групі інтактних тварин, активність iNOS зменшилася на 37,9 % ($P < 0,05$) в аорті, 43,8 % ($P < 0,05$) в серці та 40,5 % ($P < 0,05$) в сироватці крові порівняно з групою контрольної патології. Зменшення вмісту матричної РНК eNOS в аорті під впливом ОВП-1 25 мг/кг до $5,67 \pm 0,07$ % ($P < 0,05$) може бути пов'язано із посттрансляційним негативним зворотнім зв'язком через збільшення продукції оксиду азоту за участі досліджуваної сполуки, що призводить до зниження експресії мРНК eNOS. Враховуючи зазначене,

механізм антигіпертензивної дії похідного оксазолу опосередкований системою оксиду азоту.

У зв'язку із можливістю прояву антигіпертензивної дії ОВП-1 за рахунок впливу на синтез вазодилатуючого фактора циклічного гуанозинмонофосфату (цГМФ), на який також поширюється сигнальна дія NO, досліджена зміна активності його регулятора – ФДЕ під дією похідного оксазолу. У щурів із АГ, яку моделювали сольовим навантаженням, активність ФДЕ була збільшеною на 73,4 % ($P < 0,05$) в аорті, на 61,1 % ($P < 0,05$) у серці та на 34,8 % ($P < 0,05$) у сироватці крові порівняно з інтактними. Введення ОВП-1 в дозі 50 мг/кг зазначеним вище шляхом призводило до відновлення активності ФДЕ в аорті, серці та сироватці крові практично до значень, відзначених в інтактній групі. Це може свідчити про можливість розвитку судинорозширювальної дії ОВП-1 шляхом впливу останнього на збільшення синтезу цГМФ через пригнічення активності ФДЕ.

Під впливом ОВП-1 25 мг/кг вміст Ca^{2+} зменшувався на 47,3 % ($P < 0,05$) в аорті та 59,5 % ($P < 0,05$) в сироватці крові порівняно з групою контрольної патології. Ефект досліджуваної сполуки був співставним з препаратом порівняння амлодипіном 1,5 мг/кг, який зменшував вміст Ca^{2+} у досліджуваних об'єктах відповідно на 65,2 % ($P < 0,05$) та 63,2 % ($P < 0,05$) порівняно з групою контрольної патології, що може вказувати на імовірний кальційопосередкований механізм судинорозширювальної дії похідного оксазолу.

Введення ОВП-1 в дозі 25 мг/кг в цілому не викликало негативних змін та призводило до відновлення ліпідних показників насичених, ненасичених та поліненасичених ЖК в сироватці крові, аорті, серці, нирках і печінці та вмісту холестеролу в сироватці крові.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» дисертант досить кваліфіковано аналізує, пояснює та узагальнює результати власних досліджень, підсумовує і порівнює їх з відомими даними літератури.

Розділ написаний чітко та логічно, що дозволило вдало

систематизувати матеріал, отриманий дисертантом у дослідженні. Мацькевич Катерина Володимирівна, ґрунтуючись на даних наукової літератури та результати власних досліджень, вдало інтерпретує виявлений антигіпертензивний ефект ОВП-1, як сполуки-лідера ряду фосфорильованих похідних оксазолу, можливі механізми його дії та обґрунтовує доцільність подальшого вивчення сполуки в якості антигіпертензивного лікарського засобу.

Робота завершується 6 висновками, в яких дисертант логічно узагальнює фактичні результати. Висновки аргументовані результатами дослідження та відповідають завданням.

Список використаних джерел наведено в алфавітному порядку, оформлено за чинними вимогами, містить 189 джерел, з них 68 – кирилицею та 121 – латиницею. 63 % цитованих робіт датовано останніми 10 роками, що свідчить про обізнаність дисертанта щодо сучасного стану проблеми.

Ідентичність змісту автореферату й основних положень дисертації.

Тексти дисертації та автореферату написано українською мовою із дотриманням наукового стилю. Оформлення дисертації та автореферату відповідає вимогам МОН України щодо викладення, об'єму, структури, ілюстрацій, посилань та джерел наукової літератури. Автореферат відповідає дисертації за змістом та структурою.

Поряд з позитивними характеристиками роботи необхідно відмітити деякі зауваження та пропозиції:

1. У тексті дисертації, особливо в розділі 5, зустрічаються повторення даних з табличними даними.

2. До результатів експериментальних даних, наведених в таблиці 4.4, доцільно було б додати порівняльний аналіз між самцями та самками мишей.

Проте вищезазначені зауваження не зменшують загальної позитивної оцінки та значення дисертаційної роботи, яка є закінченим дослідженням з науковою новизною, теоретичним та практичним значенням одержаних результатів.

У порядку наукової дискусії вважаю доцільним, щоб дисертант відповів на наступні запитання:

1. Які інші моделі артеріальної гіпертензії, окрім сольової, Вам відомі?
2. На етапі скринінгу Ви досліджували 10 сполук ряду фосфорильованих похідних оксазолу. Як Ви вважаєте, чому найбільшу вазодилатаційну активність має сполука ОВП-1 ?
3. Як Ви вважаєте, ОВП-1 більше впливає на кальцієві канали чи цГМФ?
4. Який підхід у виборі референтних лікарських засобів Ви використовували?

Відповідність дисертації обраній спеціальності, профілю спеціалізованої вченої ради та вимогам МОН України. Дисертаційна робота Мацькевич Катерини Володимирівни «Експериментальне дослідження фосфорильованих похідних оксазолу як потенційних антигіпертензивних засобів» є завершеним науковим дослідженням, в якому отримані нові науково обґрунтовані результати, які пов'язані з вирішенням актуальної наукової проблеми, що сприятиме створенню нових лікарських засобів для оптимізації схем антигіпертензивної фармакотерапії.

Із урахуванням актуальності теми, достатнього об'єму проведених досліджень і використання адекватних експериментальних підходів та статистичних методів, а також наукової новизни, за теоретичним і практичним значенням дисертаційна робота «Експериментальне дослідження фосфорильованих похідних оксазолу як потенційних антигіпертензивних засобів» повністю відповідає сучасним вимогам, які пред'являються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а саме п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами), а її автор

Мацькевич К. В. заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук із спеціальності 14.03.05 – фармакологія.

Офіційний опонент

доктор фармацевтичних наук, професор

завідувач кафедри медичної та біоорганічної хімії

Харківського національного медичного університету

Гавриш
Г. О. Сирова

