

ВІДГУК

офіційного опонента доктора фармацевтичних наук, професора, завідувачки кафедри фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету Єрмоленко Тамари Іванівни на дисертаційну роботу Палагіної Наталії Юріївни за темою «Пошук нових ноотропних засобів серед похідних 4-амінобутанової кислоти та вивчення їх фармакодинаміки», що представлена до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 64.605.038 при Національному фармацевтичному університеті МОЗ України, що утворена наказом МОН України від 16.12.2021 р. № 1384 для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань – 22 «Охорона здоров'я», за спеціальністю 226-Фармація, промислова фармація

Актуальність обраної теми дисертації. Прогрес сучасної фармакології та практичної медицини багато в чому визначається відкриттям нових біологічно активних речовин. Особливо інтенсивно цей процес розвивається у галузі нейрофармакології, що в значній мірі пов'язано з поширеністю порушень когнітивних функцій у людини та розвитком когнітивних розладів. Що зазвичай, збільшується з віком, а глобальне підвищення тривалості життя вносить свій вклад у збільшення пацієнтів, страждаючих на когнітивні порушення, зокрема на деменцію. Певний вклад у розвиток когнітивних розладів вносять цереброваскулярні захворювання, зокрема хронічне та гостре порушення мозкового кровообігу, черепно-мозкові травми, а також депресія, хвороба Паркінсона і ускладнення від вірусних захворювань, зокрема від корона-вірусної хвороби COVID-19 та інші. Найбільш частою причиною деменції є хвороба Альцгеймера, друге місце займає судинна деменція. За прогнозами медичної статистики кількість пацієнтів з вираженими когнітивними порушеннями кожні десять років зростає вдвічі. Значна поширеність когнітивних розладів є не тільки медичною але і соціально-економічною проблемою, пов'язаною зі зростанням матеріальних витрат як на лікування пацієнтів з когнітивними розладами, так і забезпечення їхньої життєдіяльності.

Найбільш вивченими нейропротекторними лікарськими засобами (ЛЗ), що широко застосовуються, є ноотропні ЛЗ. Вони здатні покращувати когнітивну функцію шляхом модуляції швидкості запам'ятовування та тривалості зберігання отриманої інформації, а також захищати мозок від ушкодження при гіпоксії або дії інших несприятливих факторів.

Враховуючи кардинальну роль центральної нервової системи в життєдіяльності організму, виправданий пошук засобів, які мають нейропротекторний, нормалізуючий вплив на функції мозку. У зв'язку з цим розробка нових ефективних лікарських засобів, що нормалізують нейрометаболічні та церебропротекторні властивості ЦНС, зокрема інтелектуально-мнестичні функції мозку, є нині актуальною.

Тому, дослідження Палагіної Наталії Юріївни, які пов'язані з пошуком нових ноотропних засобів серед похідних 4-амінобутанової кислоти є перспективними в даному напрямку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету, що затверджена МОЗ України «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0114U000956), в якій дисертант є співвиконавцем.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність. Дисертаційна робота Палагіної Н.Ю. виконана на сучасному науковому рівні із використанням адекватних методів дослідження, достатньої кількості лабораторних тварин і визначенням інформаційних показників. Достовірність отриманих результатів підтверджує репрезентативність первинних даних, достатня кількість експериментальних досліджень, оброблених з використанням відповідних методів статистики. Фактичний матеріал повно ілюстрований таблицями і рисунками. Достовірність результатів не викликає сумнівів, оскільки базується на достатній кількості сучасних інформативних методів дослідження з використанням коректної статистичної обробки цифрового матеріалу. Наукові положення і висновки дисертаційної роботи засновані на методичних принципах, що відповідають поставленим завданням, є теоретично і експериментально обґрунтованими і логічно випливають з отриманих результатів. Усі теоретичні узагальнення і висновки дисертації базуються на результатах власних досліджень і відображають закономірності, виявлені в процесі проведених експериментів.

Наукова робота виконана у відповідності до положень з біоетики, що підтверджено комісією з біоетики Національного фармацевтичного університету (протокол №5 від 25.03.2021 р.).

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі уперше досліджена антиамнестична активність 11 похідних 4-амінобутанової

кислоти, встановлені елементи залежності «структура-антиамнестична активність».

Встановлений вплив сполуки 4-(бензил(ме-тил)аміно)бутанової кислоти (КГМ-5) на функціональний стан ЦНС та доведена антигіпоксична активність, що визначило вибір цієї сполуки як перспективної для подальших досліджень.

Вперше досліджені фармакодинаміка сполуки-лідера 4-(бензил(метил)аміно)бутанової кислоти, зокрема окремі психотропні ефекти: позитивний вплив на першу та другу фази пам'яті за умов дії амнезуючого фактора; відсутність негативного впливу на тривожність та депресивність тварин; поліпшення м'язового тону та координації рухів.

Досліджена гостра токсичність сполуки-лідера при двох шляхах введення внутрішньошлунковому та внутрішньоочеревинному і обґрунтовано належність її до V класу токсичності – практично нетоксичні сполуки.

Уперше доведена ефективність сполуки-лідера в поліпшенні когнітивних функцій в умовах гострого порушення мозкового кровообігу та на моделі закритої черепно-мозкової травми у щурів в тесті екстраполяційного вивільнення та за здатністю зменшувати виразність неврологічного дефіциту.

Доведено, що важливою складовою ноотропної дії сполуки-лідера за умов гострого порушення мозкового кровообігу є відновлення порушеного балансу збуджувальних та гальмівних нейромедіаторних амінокислот та порушеного рівня нейромедіаторів: норадреналіну, дофаміну, серотоніну та ацетилхоліну, підвищення виживання нейронів, зменшення кількості незворотно змінених клітин у гіпокампі, сенсомоторній корі, корі мозочку, що підтверджено зменшенням індексу альтерації нейроцитів.

Показано, що сполука-лідер на обох моделях сприяє нормалізації порушених процесів енергозабезпечення мозку та стану системи ПОЛ/АОЗ.

Новизна проведених досліджень захищена 2 патентами України на винахід та 2 патентами України на корисну модель.

Теоретичне значення одержаних результатів. Отримані в роботі дані щодо антиамнестичної активності досліджуваного ряду сполук та встановлені елементи залежності «структура-ефект» складають теоретичне підґрунтя для подальшого цілеспрямованого синтезу сполук з ноотропною активністю серед похідних 4-амінобутанової кислоти.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи

обґрунтовують перспективність створення на основі 4-(бензил(метил)аміно)бутанової кислоти (КГМ-5) нового ефективного та безпечного ноотропного засобу.

Результати дослідження впроваджено в науково-педагогічний процес на 6 профільних кафедрах ВНЗ України: кафедри загальної та клінічної фармації «Дніпровського національного медичного університету»; кафедри експериментальної та клінічної фармакології з клінічною імунологією та алергологією «Полтавського державного медичного університету»; кафедри фармакології з клінічною фармакологією «Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачеського»; кафедри організації та економіки фармації і технології ліків «Івано-Франківський національний медичний університет»; кафедри фармації та кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету.

Авторкою обґрунтовані нові перспективи застосування в практичній медицині 4-(бензил(метил)аміно)бутанової кислоти як ноотропного засобу з антигіпоксичною активністю, що впроваджено у вигляді інформаційного листа МОЗУ про нововведення в сфері охорони здоров'я №161-2021, 2021 р.).

Основний зміст дисертації та його оцінка. Дисертаційна робота Палагіної Наталії Юріївни структурована у відповідності до вимог МОН України та складається зі вступу, анотацій українською та англійською мовами, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», чотирьох розділів власних експериментальних досліджень, розділу «Аналізу та узагальнення результатів дослідження», висновків, списку використаних джерел літератури та додатків.

Анотація оформлена згідно з чинними вимогами.

У вступі викладено актуальність наукового напрямку, мета і завдання, наукова новизна, теоретичне і практичне значення отриманих результатів та описано особистий вклад дисертанта у виконання дисертаційної роботи, наведено наукові заходи, де проведена апробація результатів роботи, кількість публікацій, її об'єм і структура.

Огляд літератури складається з трьох підрозділів та висвітлює сучасні аспекти епідеміології, причини та фактори розвитку когнітивних порушень, їх етіопатогенетичні основи. Автором проаналізовані сучасні підходи до профілактики та лікування когнітивних порушень та показана роль ноотропних препаратів, зокрема антидементних препаратів у фармакотерапії

когнітивних порушень, наведена їхня фармакологічна характеристика, аспекти клінічної ефективності та безпеки.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» наведені хімічні формули досліджуваних сполук, препарати порівняння з обґрунтуванням вибору їхніх доз, описані методи дослідження використані автором. Розділ дає уяву про об'єм, структуру та послідовність досліджень, та представлено логічною схемою етапів дисертаційного дослідження. Використано фармакологічні, токсикологічні, біохімічні, гістологічні, статистичні методи досліджень.

У 5 розділах, що викладені на 140 сторінках наведені результати власних досліджень.

Розділ 3. Скринінгові дослідження похідних 4-амінобутанової кислоти на наявність антиамнестичної активності, встановлення залежності «структура – дія», виявлення сполук-лідерів, вивчення їх впливу на стан ЦНС і антигіпоксичної активності

У даний час пошук і розробка нових лікарських препаратів відноситься до числа найбільш складних наукових досліджень. Особливе значення для створення нового лікарського препарату у спільній роботі хіміка і фармаколога після первинного скринінгу ряду біологічно активних речовин, надається відбору із спектру вивчених сполук найбільш перспективного зразка.

У цьому розділі дисертації наведено результати скринінгових досліджень 11 похідних 4-амінобутанової кислоти в тесті УРПУ за умов дії амнезувального засобу скополаміну. За результатами скринінгу проведений аналіз залежності «структура – дія», попереднє обґрунтування вибору сполук-лідерів, а також результати вивчення їхнього впливу на стан ЦНС. Вирішальними щодо вибору однієї сполуки-лідера були результати вивчення антигіпоксичної активності.

За результатами проведеного фармакологічного скринінгу 11 похідних 4-амінобутанової кислоти були виявлені сполуки, що виявили виразну антиамнестичну активність та під їх впливом був найвищим відсоток тварин з закріпленням УРПУ: КГМ-1, КГМ-2, КГМ-5, КГМ-6. Серед чотирьох найбільш активних сполук було відібрано дві: КГМ-2 (4-(ди(гідроксиметил)аміно)бутанова кислота), КГМ-5 (4-(бензил(метил)аміно)бутанова кислота), для яких доведений дозозалежний антиамнестичний ефект. Аналіз залежності «структура-антиамнестичний ефект» серед досліджуваних 11 сполук показав, що введення гідроксиметильного

замісника до базової сполуки сприяє підсиленню антиамнестичної активності, а поєднання у структурі бензилового і метильного замісників забезпечує високу антиамнестичну дію, що продемонстровано на прикладі сполуки-лідера КГМ-5.

Автором досліджено вплив сполук-лідерів за антиамнестичною активністю на функціональний стан ЦНС мишей при одноразовому внутрішньоочеревинному введенні і встановлено, що сполука КГМ-2 (4-(ди(гідроксиметил)аміно)бутанова кислота) виявляє дозозалежну седативну дію в інтервалі доз 30-50 мг/кг; сполука КГМ-5 (4-(бензил(метил)аміно)бутанова кислота) виявляє седативну дію в дозі 30 мг/кг та не має такої в дозі 50 мг/кг. В подальшому наявність антигіпоксичної дії у 4-(бензил(метил)аміно)бутанової кислоти (сполука КГМ-5) на моделі гіперкапнічної нормобаричної гіпоксії стало остаточним критерієм обґрунтування доцільності її подальшого дослідження як перспективного нового ноотропного засобу.

Розділ 4. Вивчення психотропних властивостей сполуки-лідера КГМ-5 та її гострої токсичності

У дослідженнях з розробки нового лікарського препарату особливе значення має адекватна подальша оцінка безпеки та фармакологічної активності вибраної сполуки.

Дисертантка дослідила вплив сполуки КГМ-5 на фази пам'яті (першу – процес введення та первинної обробки інформації, другу – процес фіксації пам'ятного сліду та третю – процес репродукції пам'ятного сліду) та довгострокову пам'ять, тривожність і депресивність тварин, тонус м'язів і координацію рухів, а також вивчила гостру токсичність сполуки при внутрішньошлунковому та внутрішньоочеревинному введенні мишам.

У результаті досліджень було встановлено, позитивний вплив сполуки КГМ-5 при порушенні процесу введення та первинної обробки інформації (перша фаза пам'яті), при порушенні процесу фіксації пам'ятного сліду (друга фаза пам'яті), а також на довгострокову пам'ять і відсутність впливу на третю фазу пам'яті – процес репродукції пам'ятного сліду. Доведено, сполука КГМ-5 в умовно-ефективній дозі 30 мг/кг при одноразовому введенні не підвищує тривожність тварин, не спричиняє несприятливих змін поведінки тварин, зокрема, не призводить до їх депресивності, позитивно впливає на м'язовий тонус та координацію рухів. Встановлено, що LD_{50} сполуки КГМ-5 при внутрішньошлунковому введенні

становить понад 5000 мг/кг, при внутрішньоочеревинному введенні – 3430 мг/кг, що свідчить про безпечний профіль даної сполуки.

Розділ 5. Дослідження ефективності сполуки-лідера КГМ-5 на моделі гострої ішемії мозку

Оцінку ефективності сполуки-лідера КГМ-5 на моделі гострого порушення мозкового кровообігу авторка провела за функціональними (виразність неврологічного дефіциту, показники стану когнітивних функцій в тесті «екстраполяційного вивільнення»), нейрохімічними (вплив на рівень нейромедіаторних амінокислот та нейромедіаторів у головному мозку) та морфологічними критеріями (оцінка функціональної активності нейронів, індексу їхньої альтерації та стану судин у сенсомоторній корі, гіпокампі, корі мозочку).

Був отриманий аргументований висновок про церебропротекторні та ноотропні властивості сполуки-лідера КГМ-5. Була встановлена її здатність зменшувати виразність неврологічного дефіциту, покращувати когнітивні функції в тесті екстраполяційного вивільнення; нормалізувати порушені енергетичні процеси та стан системи пероксидне окиснення ліпідів / антиоксидантний захист (ПОЛ/АОЗ); відновлювати порушений баланс збуджувальних (глутамінової та аспарагінової) та гальмівних (ГАМК та гліцину) нейромедіаторних амінокислот та підвищувати рівень гальмівних амінокислот ГАМК та гліцину, знижувати підвищений рівень нейромедіаторів норадреналіну та дофаміну, і підвищувати рівень ацетилхоліну. У результаті гістологічних досліджень було доведено здатність сполуки КГМ-5 покращувати мозковий кровообіг, збільшувати виживання нейронів, зменшувати кількість незворотно змінених клітин у сенсомоторній корі, гіпокампі, корі мозочку. Авторка висновує, що церебропротекторна активність сполуки не поступається ефекту препарату порівняння «Пікамілон».

У шостому розділі дисертантка наводить результати дослідження церебропротекторної активності сполуки КГМ-5 на моделі закритої черепно-мозкової травми.

Розділ 6. Церебропротекторна активність сполуки-лідера КГМ-5 в умовах експериментальної закритої черепно-мозкової травми

За результатами дослідження доведено, що сполука КГМ-5 у щурів з моделлю ЗЧМТ сприяє зменшенню ступеня неврологічного дефіциту, покращанню когнітивних функцій та поліпшенню рухової активності тварин, поліпшує стан енергозабезпечення у мозку, про що свідчить збереження

активності сукцинатдегідрогенази у гомогенаті мозку, а також процесів ПОЛ і антиоксидантного захисту.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» авторкою ґрунтовно та логічно проаналізовано одержані у різних розділах результати. Ознайомлення з цим розділом дає підставу стверджувати, що дисертантка володіє сучасними знаннями з наукової проблеми фармакологічної корекції когнітивних розладів, грамотно зіставляє одержані результати з даними літератури.

Стиль викладу власних результатів досліджень чіткий, що дозволило дисертанту систематизувати отриманий матеріал і зробити науково обґрунтовані висновки (всього 7), які відповідають поставленій меті і завданням дисертаційної роботи, є обґрунтовані та аргументовані результатами статистичного аналізу.

Список літератури містить 276 посилань (з них 129 – латиницею та 147 – кирилицею), оформлений згідно з чинними вимогами.

Повнота викладу наукових положень дисертації в наукових працях. Основні положення дисертаційної роботи висвітлені у 18 наукових працях, зокрема у 7 статтях (із них 5 – опубліковані у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 – у виданні Scopus, 1 – у закордонному фаховому виданні), 2 патентах України на винахід та 2 патентах України на корисну модель, 6 тезах доповідей, 1 інформаційному листі.

Публікації висвітлюють усі розділи дисертаційної роботи.

Зауваження, що стосуються її змісту та оформлення.

У виконанні роботи витримано послідовність наукового пошуку з порівняльним аналізом автором отриманих даних. Робота написана грамотно, логічно з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту та технічного оформлення.

Отримані результати наукового дослідження слід вважати такими, що не викликають сумнівів.

Істотні недоліки в дисертаційній роботі не виявлені.

У результаті ознайомлення з дисертацією виникли певні зауваження:

1. В роботі зустрічаються технічні помилки, так назва препарату пікамілону з великої і з маленької літери, зустрічається назва в лапках і без лапок.
2. При вивченні антигіпоксичних властивостей досліджуваних сполук, у якості препарату порівняння Вами було взято пірацетам, який не виявив антигіпоксичний ефект, який у пірацетаму проявляється дуже повільно за

рахунок покращення мозкового кровообігу та енергетичних процесів, як Ви вірно відмітили. Тоді потрібно було б взяти препарат порівняння безпосередньо із групи антиоксидантів, щоб була можливість порівняти.

3. На моделі гострого порушення мозкового кровообігу сполука КГМ-5 поліпшувала мозковий кровообіг, про що свідчить зменшення виразності спазму капілярів. А пірацетам не впливає на тонус судин, він покращує мозковий кровообіг за рахунок антиагрегантної дії, покращення мікроциркуляції, то можливо було б доцільно дослідити антиагрегантну дію КГМ-5.

Наведені зауваження принципово не змінюють оцінку дисертаційної роботи.

При ознайомленні з дисертаційною роботою виникли запитання, які доцільно обговорити в ході наукової дискусії:

1. З чим пов'язано, що дози препаратів порівняння в проведених дослідженнях використовувались різні: пірацетам спочатку брали 200 мг/кг, а потім 300 мг/кг; гопантенова кислота 150 мг/кг і 85 мг/кг.
2. Чому Вами не було вивчено протисудомну дію сполуки-лідера КГМ-5, враховуючи, що препарат порівняння гопантенова кислота володіє протисудомною активністю, а пірацетам навпаки володіє здатністю знижувати поріг судомної готовності та викликати активацію епілептичних нападів.

Всі зауваження та запитання носять характер наукової дискусії та не впливають на актуальність, наукову новизну та практичну значимість роботи.

Безумовно, при дослідженні нової сполуки в об'ємі однієї дисертаційної роботи неможливо дослідити всі можливі фармакологічні властивості, але проаналізувавши роботу, стає зрозумілим, що здобувачем отримано нові відомості щодо спектру фармакологічної активності нової сполуки-лідера КГМ-5, що дає підставу рекомендувати досліджуваний засіб для подальшого фармакологічного дослідження з метою створення нового лікарського засобу ноотропної дії для лікування та профілактики цереброваскулярних порушень.

Відповідність дисертації обраній спеціальності, профілю спеціалізованої вченої ради та вимогам МОН України

Дисертаційна робота Палагіної Наталії Юріївни за темою: «Пошук нових ноотропних засобів серед похідних 4-амінобутанової кислоти та вивчення їх фармакодинаміки» є завершеним науковим дослідженням і за

актуальністю, новизною, практичною значущістю отриманих результатів, ступенем обґрунтованості висновків відповідає вимогам п.10 Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою КМУ від 6 березня 2019 № 167 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ від 21 жовтня 2020 № 979 та від 9 червня 2021 № 608) щодо дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань – 22 «Охорона здоров'я», за спеціальністю 226-Фармація, промислова фармація, а її автор заслуговує присудження ступеня доктор філософії.

Офіційний опонент,
завідувачка кафедри фармакології та медичної рецептури
Харківського національного
медичного університету МОЗ України,
доктор фармацевтичних наук,
професор



Єрмоленко Т. І.