

РЕЦЕНЗІЯ

заступника директора з наукової роботи Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету, кандидата біологічних наук, доцента **Литкіна Дмитра Віталійовича** на дисертаційну роботу **Боцули Ірини Валеріївни** за темою **«Експериментальне дослідження нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів»**, яку подано до спеціалізованої Вченої ради ДФ 64.605.097 при Національному фармацевтичному університеті МОЗ України, що утворена наказом від 30.08.2024 р. № 70-Адм. 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»

Обґрунтування вибору теми дослідження

Триазолобензодіазепіни — це клас сполук, що поєднують властивості бензодіазепінів та триазолів. Вони можуть виявляти широкий спектр фармакологічних активностей: протівірусну, протизапальну, протипухлинну, анальгетичною, анксіолітичну, седативну, протисудомну та міорелаксуючу. Основний механізм дії цих сполук пов'язаний з їхньою взаємодією з ГАМК_A-рецепторами центральної нервової системи, що забезпечує регуляцію передачі нервового збудження. Їх унікальна структура може забезпечити більшу селективність дії, що допомагає знизити ризик таких побічних ефектів, як надмірна седация й розвинення толерантності та/або адикції.

Зростання поширеності тривожних розладів, пов'язаних зі стресом, вимагають від фармацевтичної індустрії розробки ефективних фармакологічних підходів для покращення якості життя таких пацієнтів. У цьому контексті похідні бензодіазепінів продовжують бути перспективними для подальшої розробки та удосконалення завдяки своїм фармакодинамічним характеристикам, зокрема вираженій протитривожній дії. Ця група препаратів зберігає ключову роль у клінічній практиці, сприяючи успішному лікуванню

тривожних та інших психоневрологічних розладів. Триазольні фрагменти в структурі бензодіазепінів можуть модифікувати їхню біологічну активність, зокрема забезпечувати посилення анагетичного ефекту. Завдяки цьому перспективним напрямом є дослідження нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, які можуть виступати як потенційні протитривожні засоби з вираженою анагетичною дією. Такий підхід відкриває можливість створення препаратів, що поєднують в собі кілька важливих фармакологічних властивостей, зокрема для терапії тривожних розладів та болю.

Дисертація Боцули Ірини Валеріївни присвячена експериментальному обґрунтуванню можливості застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в якості потенційних протитривожних засобів, що є своєчасним та актуальним.

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

Дисертаційна робота Боцули І.В. виконана відповідно до плану затвердженої МОЗ України науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0114U000956), в якій дисертантка є співвиконавцем.

Наукова новизна одержаних результатів.

За проведеними експериментальними дослідженнями дисертанткою вперше встановлено відсутність цитотоксичного та генотоксичного впливу нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в умовах *in vitro* на життєздатність та метаболічну активність мітохондрій культур клітин BALB/c 3Т3 та ріст штаму *S. typhimurium* у відповідних тестах, визначено їхню анксиолітичну, антидепресивну, анагетичну активності, невиражений вплив на м'язовий тонус та поведінкові реакції гризунів. За результатами скринінгу відібрано похідні МА-252, МА-253 та МА-254 для подальшого дослідження.

Дисертанткою вперше сформовано нановолокна, завантажені похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, за допомогою технології електропрядіння з метою покращення їх розчинення, пероральної біодоступності та

терапевтичної ефективності, та проведено фармакологічні дослідження *in vivo*. Встановлено підвищення анксиолітичної, антидепресивної, аналгетичної активностей на тлі введення отриманих нановолокон гризунам в порівнянні зі скринінговими дослідженнями.

Поглиблене дослідження похідного МА-253, що показало себе як сполука-лідер в попередніх дослідженнях, виявило його актопротекторну активність при застосуванні у тварин обох статей, потенціювання ним дії етанолу, пролонгуючи тривалість бічного положення, а також антагонізм до кофеїну. Вперше під час проведення експерименту при тривалому введенні тваринам похідного МА-253 визначено відсутність розвитку толерантності до його дії, а саме: спостерігались значна анксиолітична активність, стимулювальний вплив на локомоторно-дослідницьку поведінку, позитивний ефект на фізичну витривалість у щурів обох статей. За умов однократного гострого мишам та тривалого щурам протягом 28 днів введення встановлено сприятливий токсикологічний профіль обраного похідного 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну.

Вперше розроблено та оптимізовано склад нових функціоналізованих формул поліетиленоксидного гелю, що поєднують нановолокна, завантажені МА-253, та сухий екстракт кропиви собачої трави, модифікований валіном, для фармацевтичного напівтвердого екструзійного 3D-друку, а також встановлено придатність надрукованих 3D-зразків для перорального застосування з негайним вивільненням, що в подальшому може бути використано при створенні персоналізованих лікарських препаратів.

Наукова новизна дисертаційного дослідження захищена 2 патентами України на корисну модель №155538 (06.03.2024, Бюл. №10), №156108 (08.05.2024, Бюл. №19).

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.

Отримані результати закладають основу для розробки нових лікарських засобів з анксиолітичною та аналгетичною дією на основі похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Ці сполуки виявляють широкий спектр

фармакологічної активності, не викликають толерантності при повторних введеннях та мають сприятливий профіль безпеки як при одноразовому, так і при тривалому використанні.

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджені у науково-педагогічний процес кафедр 5 закладів вищої освіти України.

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

Дисертаційна робота Боцули Ірини Валеріївни виконана на сучасному науковому рівні з використанням достатнього обсягу даних експериментальних досліджень. Методи, використані в дослідженні, відповідають поставленим завданням. Кількість проведених експериментів є достатньою для надійної аргументації основних положень дисертації. Висновки обґрунтовані, логічно впливають із отриманих результатів, включають нові наукові елементи та мають значне науково-практичне значення.

Повнота викладення матеріалів дослідження.

Основні положення дисертації викладені в 19 наукових роботах, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 індексуються в наукометричній базі Scopus, 2 патенти України на корисну модель, 12 тез доповідей. Результати роботи обговорено на науково-практичних конференціях та семінарах різного рівня.

Аналіз змісту дисертаційної роботи, її завершеності та оформлення.

Дисертаційна робота викладена на 274 сторінках та складається з анотації українською та англійською мовами, змісту, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження» та 5 розділів з результатами власних експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, загальних висновків, списку використаних джерел і додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 38 таблицями та 46 рисунками. Список використаних джерел налічує 273 найменувань, із них 45

кирилицею та 228 латиницею. Отже, структура та обсяг роботи відповідають вимогам МОН України.

Анотації наведені українською та англійською мовами і містять стислий огляд результатів проведених досліджень в рамках дисертаційної роботи.

У вступі викладено актуальність наукового напрямку, мета і завдання, наукова новизна і практична значущість отриманих результатів та описано особистий вклад дисертантки у виконання дисертаційної роботи, перераховано наукові заходи, де проведена апробація матеріалів роботи, наведені її об'єм і структура.

В огляді літератури, структурованому на 5 підрозділів, дисертанткою висвітлено розповсюдженість та патогенез тривожних розладів, розглянуто підходи до терапії, а також проведено аналіз асортименту препаратів на основі похідних бензодіазепінів на фармацевтичному ринку України. В останньому підрозділі показано обґрунтування доцільності застосування похідних триазолобензодіазепінів як потенційних анксіолітиків.

У розділі «Матеріали і методи дослідження» дисертанткою представлена характеристика досліджуваних похідних та препаратів порівняння, описані експериментальні моделі. Усі протоколи експериментів на хребетних тваринах були схвалені Комісією з питань біоетики НФаУ (протокол № 4 від 02.10.2020 р. та протокол №9 від 03.05.2023 р.). Під час виконання дисертаційної роботи авторкою було використано метод гнучкого рецепторно-орієнтованого докінгу, фармакологічні, токсикологічні, технологічні, біохімічні, гістологічні, статистичні методи дослідження. Використані методи є адекватними поставленим меті та завданням дисертаційного дослідження.

У третьому розділі дисертаційної роботи продемонстровано результати молекулярного докінгу нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів відносно бензодіазепінового сайту ГАМК рецептора та визначено молекулу-хіт (похідне МА-253) яка мала вищі абсолютні значення скорингової функції порівняно з діазепамом і гідазепамом. Дослідження *in vitro* показали

відсутність у похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів вираженого цитотоксичного ефекту, а також фототоксичності та генотоксичності в досліджуваному діапазоні концентрацій, в умовах проведення тестів МТТ, поглинання нейтрального червоного барвника та уму-тесту. Наведені результати скринінгових досліджень фармакологічної активності обраних похідних. Найвиразніший анксиолітичний ефект характерний для похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг, антидепресивний – для МА-253, МА-254 і МА-255 у дозах 1 мг/кг. При дослідженні впливу нових похідних триазолобензодіазепінів на тонус скелетних м'язів у гризунів встановили невиражений міорелаксантийний ефект при введенні МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг. В тесті «відкрите поле» визначено, що найбільш виразні зміни спостерігаються при застосуванні похідного МА-253 в дозі 1 мг/кг, яке підвищує рівень локомоторної та орієнтовно-дослідницької активностей, а також знижує кількість емоційних реакцій у тварин. Цей ефект за характером впливу був подібний до дії препарату порівняння гідазепаму в дозі 1 мг/кг.

Четвертий розділ дисертації представляє результати визначення анальгетичної та антигіпоксичної активностей похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. У тесті «гарячої пластини» відзначено збільшення латентного періоду реакції поведінкової відповіді на болюче подразнення терморекторів кінцівок щурів під впливом похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг, а на моделі «оцтовокислих корчів» ці ж похідні призводили до зменшення кількості проявів специфічної реакції на хімічне подразнення. За умов нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією похідні МА-252, МА-253 та МА-255 не проявили антигіпоксичних властивостей, водночас введення МА-254 в дозі 1 мг/кг пролонгувало тривалість життя мишей.

У п'ятому розділі дисертаційної роботи здійснено опис результатів створення нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, за допомогою технології електропрядіння та встановлено

підвищення їхньої фармакологічної активності в порівнянні з результатами скринінгового дослідження.

У шостому розділі дисертанткою проведено поглиблене вивчення сполуки-лідера МА-253. У тесті «плавання з навантаженням» похідне МА-253 продемонструвало позитивний вплив на фізичну витривалість, підвищуючи її незалежно від статі піддослідних. При визначенні взаємодії МА-253 зі сполуками пригнічувального та стимулювального типу дії на ЦНС встановлено потенціювання ним дії етанолу та антагонізм до кофеїну. Тривале застосування (28 днів) похідного МА-253 у гризунів не викликало розвитку толерантності до фармакологічних ефектів, визначених раніше. Внутрішньошлункове введення досліджуваного похідного у дозі 2500 мг/кг протягом 14 діб не призвело до загибелі тварин, тобто значення LD_{50} перевищує 2500 мг/кг. Похідне МА-253 може бути віднесене до IV класу – малотоксичних речовин за класифікацією Hodge та Sterner. Похідне МА-253 при дослідженні підгострої токсичності при застосуванні протягом 28 днів не викликає достовірних відмінностей динаміки маси тіла, показників функціонального стану сечовидільної та гепатобіліарної систем, не впливає на масові коефіцієнти внутрішніх органів, їхню гістоструктуру. Варто відзначити, що гістологічні дослідження були проведені відносно органу метаболізму (печінка), органу екскреції (нирки) та локусу дії (головний мозок), що є достатнім для визначення ймовірного токсикологічного профілю на даному етапі дослідження біологічно активних сполук.

Сьомий розділ дисертаційної роботи присвячений встановленню можливості напівтвердого екструзійного 3D-друку функціональних ПЕО гелів, завантажених похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну та сухим екстрактом кропиви собачої трави, модифікованим валіном. Надруковані 3D-зразки показали помірну або хорошу якість друку та хорошу відтворюваність, таким чином припускаючи, що такі функціональні ПЕО гелі придатні для використання за призначенням.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів» авторкою проведено систематизацію та аналіз отриманих результатів дослідження. Порівняння із сучасними науковими дослідженнями із цього напрямку дозволяє припустити ймовірний механізм реалізації кожного із фармакологічних ефектів нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

Логічний стиль викладу аналізу результатів, дозволив авторці зробити науково обґрунтовані висновки, які відповідають поставленій меті та завданням дисертаційної роботи.

Список використаних джерел наданий на 34 сторінках у порядку появи посилань у тексті та оформлений відповідно до чинних вимог.

Рукопис завершується додатками, що містять список публікацій здобувача та апробацію дисертаційної роботи, повідомлення про встановлення дати подання двох заявок на винахід, акти впровадження результатів дослідження в науково-педагогічний процес кафедр закладів вищої освіти України.

У дисертаційній роботі відсутні ознаки порушення академічної доброчесності. Текст викладено українською мовою із дотриманням наукового стилю.

Істотні недоліки в дисертаційній роботі не виявлені, у процесі ознайомлення з нею маю висловити зауваження:

1. У дисертації присутні технічні недоліки оформлення роботи (технічні помилки, розриви при переносі значень й одиниць виміру тощо), по тексту роботи зустрічаються окремі невдалі стилістичні вирази.

2. Тести, використані дисертанткою для визначення міорелаксантиї дії («вертикальна сітка» та ротарод-тест), не є специфічними для визначення саме цього виду активності. Вони не дають можливості істотно відрізнити міорелаксанти від актопротекторів, нейролептиків, або речовин з виразною нейротоксичною дією. На думку рецензента, більш вдалим рішенням було б обмежитися висновком щодо відсутності у досліджуваних зразків значущого впливу на координацію рухів при інтерпретації результатів цих тестів.

3. В дисертації не має порівняння ступеню активності речовин-лідерів в істотному вигляді та відповідних нановолокон, завантажених ними, в одному експерименті, що дає лише опосередковане розуміння про переваги використання нановолокон в якості засобу доставки діючої речовини. Також, на думку рецензента, в дослідженнях з нановолокнами більш обґрунтованим було б використання «плацебо» (нановолокна без діючої речовини із розчинником) у тварин групи контролю замість просто розчинника.

Втім, зазначене зауваження не є суттєвим та не знижує наукової та практичної цінності представленої дисертації.

Під час ознайомлення з дисертаційною роботою виникли наступні запитання, які вважаю за доцільне обговорити в ході наукової дискусії:

1. Чим опосередкований фармакологічний сенс поєднання нановолокон з МА-253 з екстрактом кропиви собачої трави, модифікованого валіном, у складі ПЕО гелів? Якого ефекту Ви очікували досягти за рахунок такої комбінації?

2. Враховуючи, що основним механізмом фармакологічної дії триазолобензодіазепінів Ви вважаєте посилення гальмуючого впливу ГАМК-ергічного сигналу на ЦНС, то чим Ви можете пояснити відсутність ознак вираженої седатії тварин, відсутність впливу на координацію рухів та очевидну наявність актопротекторних властивостей у сполук-лідерів?

3. Чим Ви можете пояснити, що за доведеного потужного анксиолітичного впливу нановолокон, завантажених сполукою-лідером МА-253, у тварин, що отримували цей засіб, зростала кількість локомоторно-дослідницьких реакцій у порівнянні з контролем, що в даному контексті може навпаки сприйматися ознакою стурбованості тварин?

Висновок про відповідність дисертації обраній спеціальності, профілю спеціалізованої вченої ради та вимогам МОН України.

З усього вищевикладеного можна зробити висновок про те, що дисертаційна робота Боцули Ірини Валеріївни за темою «Експериментальне дослідження нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як

потенційних протитривожних засобів» є закінченою науковою працею. За актуальністю, науковою новизною, обсягом проведених досліджень, ступенем обґрунтованості наукових положень та рівнем впровадження одержаних результатів рецензована дисертаційна робота відповідає вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою КМУ від 12 січня 2022 року № 44, а її автор, Боцула Ірина Валеріївна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

Рецензент:

заступник директора з наукової роботи

Навчально-наукового інституту прикладної фармації

Національного фармацевтичного університету,

Кандидат біологічних наук, доцент

Дмитро ЛИТКІН