

ВІДГУК

офіційного опонента, завідувачки кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, доктора медичних наук, професора Волощук Наталії Іванівни

на дисертаційну роботу Боцули Ірини Валеріївни за темою **«Експериментальне дослідження нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів»**, подану 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.

Тривожні розлади є одним із найпоширеніших психічних захворювань, які можуть стати причиною розвитку інвалідності та належать до хронічних станів, здійснюючих найбільший вплив на життя пацієнтів, а також характеризуються частою коморбідністю з іншими розладами, зокрема больовими синдромами. Різноманітні фактори, такі як постійний стрес на роботі чи в навчанні, встановлення складних діагнозів на термінальних стадіях захворювань або воєнні дії, можуть суттєво змінювати стиль життя людини. Світова пандемія COVID-2019 виступила провокуючим фактором загострення вже наявних психічних порушень та значно прискорила темпи поширення нових випадків тривожних розладів за 2020 р. порівняно з 2019 р. в середньому на 25% по всьому світу. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, близько 275 мільйонів людей у світі страждають від тривожних розладів, що становить приблизно 3,6% світового населення. На жаль, ця кількість невпинно зростає під впливом військово-політичних конфліктів, швидкого розвитку суспільства та моральних викликів, які впливають на поведінкові реакції окремих людей.

Пошук нових фармакологічних методів лікування тривожних станів обумовлений зростаючою потребою в медичній спільноті покращити як ефективність, так і профіль безпеки існуючих анксиолітичних препаратів. Оскільки традиційні засоби часто супроводжуються побічними ефектами, такими як залежність, седативна дія та когнітивні порушення, розробка нових, більш безпечних і дієвих лікарських засобів стає пріоритетним завданням у сучасній психофармакології.

Дисертація Боцули Ірини Валеріївни присвячена експериментальному обґрунтуванню можливості застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в якості потенційних протитривожних засобів зі сприятливим профілем безпеки як при одноразовому, так і при тривалому використанні, а також відсутністю толерантності при застосуванні протягом 4 тижнів.

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

Дисертація виконана у межах запланованої 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.

Робота має беззаперечну наукову новизну, оскільки вперше проведено дослідження фармакодинаміки нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Оцінку безпечності досліджуваних похідних проведено в умовах *in vitro*, продемонстровано відсутність їхнього токсичного впливу на виживання клітин культури BALB/c 3T3 та мітохондріальну метаболічну активність в тестах МТТ та поглинання нейтрального червоного барвника, а також ріст штаму *S. typhimurium* в уму-тесті. Під час скринінгових досліджень фармакологічної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів встановлено їхні анксиолітичні властивості в стандартних тестах піднесеного хрестоподібного лабіринту і темно-світлої камери, де спостерігали збільшення тривалості перебування на відкритому просторі

приладів, антидепресивну активність за зменшенням тривалості нерухомого стану в тестах плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст». Крім того, було встановлено відсутність вираженого міорелаксуючого ефекту в тестах вертикальної сітки і ротароду, а також зменшення рівня тривожності та психоемоційного напруження в тесті «відкрите поле». При відтворенні тесту гарячої пластини та моделі оцтовокислих корчів із залученням тварин визначено потенційну аналгетичну активність на тлі введення похідних МА-252, МА-253 та МА-254.

Вперше, застосовуючи технологію електропрядіння, дисертанткою сформовано нановолокна, заповнені похідними МА-252, МА-253 та МА-254, та здійснено дослідження їхньої ефективності *in vivo*. Виявлено покращення анксіолітичної, антидепресивної, аналгетичної активностей у порівнянні з попередніми проведеними дослідженнями.

Поглиблене дослідження проведено для похідного МА-253, що проявило найвиразніші фармакодинамічні ефекти в попередніх дослідженнях. Встановлено актопротекторну активність нановолокон, завантажених обраним похідним, у тесті вимушеного плавання з навантаженням. Вперше виявлено потенціювання МА-253 дії етанолу під час відтворення моделі наркозу, а також антагонізм до кофеїну та посилення гальмівних аденозинергічних впливів у ЦНС в тесті «відкрите поле».

Вперше визначено анксіолітичну активність, поведінкові реакції та фізичну витривалість тварин при тривалому введенні МА-253 та з'ясовано відсутність розвитку толерантності до його дії. Безпечність використання МА-253 була підтверджена в умовах одноразового гострого введення мишам та тривалого 28-денного застосування у щурів: поведінка і зовнішній вигляд тварин залишалися незмінними, загальнотрофічні процеси, а також функції печінки та нирок не відрізнялися від показників у контрольній групі.

Вперше в межах дисертаційної роботи розроблено та оптимізовано склад нових функціоналізованих формул ПЕО-гелю, що включають нановолокна, завантажені МА-253, і сухий екстракт кропиви собачої трави,

модифікований валіном, для фармацевтичного напівтвердого екструзійного 3D-друку. Визначено придатність надрукованих 3D-зразків для перорального застосування з негайним вивільненням, що може бути використано для створення персоналізованих лікарських препаратів у подальшому.

Наукова новизна дисертаційного дослідження захищена 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 формують теоретичну базу для подальшої розробки лікарських засобів з анксиолітичною та аналгетичною дією на основі похідних 1,2,3-триазолло-1,4-бензодіазепінів, які не викликають толерантності при застосуванні протягом 28 днів і мають сприятливий профіль безпеки як при одноразовому, так і при тривалому використанні.

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

Рівень виконання поставленого наукового завдання та оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

В процесі підготовки та виконання дисертаційного дослідження авторкою проведений інформаційно-патентний пошук, у роботі проаналізовано достатню кількість джерел зарубіжної і української літератури переважно за останні роки, цілком логічно вибрано важливий, перспективний та своєчасний напрямок роботи, що дало змогу поставити наукове завдання, сформулювати мету роботи, здійснити вибір методів її досягнення. Дисертантка опрацювала та провела ретельний аналіз матеріалів наукової літератури за темою дослідження, що відобразилось у високому рівні систематизації відомих знань у огляді літератури дисертації. Авторка самостійно виконала дослідження, опрацювала отримані дані, провела інтерпретацію та аналіз одержаних результатів та їх співставлення з відомими даними наукової літератури, написала усі розділи власних досліджень, самостійно оформила дисертаційну роботу відповідно до загальноприйнятих

вимог. Аналіз наукової новизни, теоретичного та практичного значення роботи, ступеню впровадження її результатів переконливо свідчать, про оволодіння в повній мірі методологією наукової діяльності Боцули І.В., що надало змогу виконати поставлене наукове завдання на високому науково-методичному рівні.

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

Дослідження в рамках дисертаційної роботи, проведені в умовах *in vitro* та *in vivo*, виконані на сучасному науково-методичному рівні та представляють практичне значення і теоретичне обґрунтування. Під час виконання дисертаційної роботи дисертанткою використані фармакологічні, токсикологічні, технологічні, біохімічні, гістологічні та статистичні методи дослідження, які є адекватними поставленим меті та завданням дисертаційного дослідження. Загальні висновки аргументовані, викладені чітко і повністю відображають результати проведених досліджень, їх достовірність безсумнівна. Усі експерименти із залученням гризунів проведено у відповідності до положень гуманного ставлення до тварин та схвалені Комісією з питань біоетики НФаУ (протокол № 4 від 02.10.2020 р. та протокол №9 від 03.05.2023 р.).

Повнота викладення матеріалів дослідження.

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 19 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях, з них 2 індексуються в наукометричній базі Scopus (quartile 1 та 3), 12 тез доповідей, 2 патенти України на корисну модель. Результати роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях та семінарах різного рівня.

Аналіз змісту дисертаційної роботи, її завершеності та оформлення.

Дисертаційна робота Боцули Ірини Валеріївни структурована у відповідності до вимог МОН України на 274 сторінках машинопису. Вона складається з анотації українською та англійською мовами, змісту, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 5 розділів з

результатами власних експериментальних досліджень, розділу «Аналізу та узагальнення одержаних результатів», висновків, списку використаних джерел і 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Анотації оформлені згідно з чинними вимогами. Робота ілюстрована 38 таблицями та 46 рисунками.

У **вступі** авторка обґрунтовує актуальність досліджуваної проблеми, чітко формулює мету, 8 завдань, об'єкт та предмет дослідження, наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, зазначає особистий внесок здобувача, апробацію результатів та наводить головні відомості про дисертаційну роботу.

Розділ 1 присвячений **огляду літератури**, в якому розглянуто проблему тривожних розладів, їхню поширеність та патофізіологію, підходи до терапії похідними бензодіазепінів, проведено аналіз ринку України та обґрунтовано доцільність використання похідних триазолобензодіазепіну в якості анксиолітичних засобів.

У **розділі 2 «Матеріали і методи дослідження»** наведено хімічну будову 5 нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, синтезованих співробітниками лабораторії фізико-хімічних процесів ДНУ НТК «Інститут монокристалів» НАН України під керівництвом першого заступника генерального директора з наукової роботи, члена-кореспондента НАН України, професора В. А. Чебанова. Описано загальний дизайн експерименту та детальний опис експериментальних моделей, що використовувались під час виконання дисертаційної роботи.

У **розділі 3 «Скринінгові дослідження токсикологічних характеристик *in vitro* та фармакологічної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів»** дисертанткою наведені результати молекулярного докінгу нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів відносно бензодіазепінового сайту ГАМК рецептора, їхнього впливу на життєздатність клітин у тестах МТТ та поглинання нейтрального червоного барвника, а також на ріст бактеріальних клітин в умовах уму-тесту,

скринінгових досліджень за анксіолітичною та антидепресивною активностями, їхнього впливу на м'язовий тонус та координацію рухів, а також поведінкові реакції гризунів.

У розділі 4 «Визначення фармакологічної активності сполук-лідерів серед нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів» визначено їхню аналгетичну в тесті «гарячої пластини» та на моделі «оцтовокислих корчів» та антигіпоксичну активності в умовах гострої нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією.

Розділ 5 «Визначення фармакологічної активності сполук-лідерів серед нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, завантажених в нановолокна» присвячено опису процесу створенню нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, за допомогою технології електропрядіння та визначенню їхньої фармакологічної активності в тестах, використаних для скринінгового вивчення.

У розділі 6 «Поглиблене дослідження сполуки-лідера» дисертанткою наведені результати визначення актопротекторної активності похідного МА-253, його взаємодії зі сполуками пригнічувального та стимулювального типу дії на ЦНС, визначення можливості розвитку толерантності до фармакологічних ефектів, визначених раніше, протягом тривалого застосування (28 днів) гризунам, а також вивчення гострої та підгострої токсичностей.

У розділі 7 «Напівтвердий екструзійний 3D-друк функціоналізованих поліетиленоксидних гелів, завантажених нановолокнами 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну та сухим екстрактом кропиви собачої трави (*Leonurus cardiaca* L.), модифікованого валіном» описано фізичний вигляд та в'язкість ПЕО приготовлених гелів, продемонстровано можливості виконання 3D-друку, виконано тест на розчинення друкованих решіток в очищеній воді та визначено вміст флавоноїдів в них.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів» авторкою здійснено систематизацію та обговорення отриманих результатів та їх співставлення з існуючими сучасними даними. Дисертанткою зроблені припущення щодо можливих механізмів реалізації фармакологічної активності на тлі введення нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

Наведені **висновки** дисертаційної роботи відповідають поставленим завданням та відображають основні положення дисертації, що є критерієм завершеності роботи.

Список використаних джерел налічує 273 найменування, із них 45 кирилицею та 228 латиницею, представлений у порядку появи посилань у тексті та оформлений відповідно до чинних вимог.

У **додатках** авторка представляє список публікацій здобувача за темою дисертації та апробацію роботи, повідомлення про встановлення дати подання двох заявок на винахід, акти впровадження результатів дослідження в науково-педагогічний процес кафедр закладів вищої освіти України.

Під час аналізу матеріалів дисертації та наукових публікацій дисертантки не було виявлено ознак академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійність виконання представленого наукового дослідження. Текст викладено українською мовою із дотриманням наукового стилю.

Істотні недоліки в дисертаційній роботі не виявлені. Варто відмітити окремі зауваження та побажання:

1. Окремі граматичні та комп'ютерні неточності. Так, напр. с.С 49 та 64 тварини названі «безпородними». Їх слід називати «НЕЛІНІЙНІ»
2. Незрозумілим залишились вибір доз сполук, які досліджувала автор, а також нечітко вказані способи та режими введення.
3. В окремих розділах роботи (напр. розділи 3.3.4 та 6.4) містяться фрагменти порівняння власних результатів з даними інших авторів, що краще було би перенести в обговорення.

4. На с. 154 авторка вживає термін «суперадитивіна». Він не зовсім зрозумілий. Малось на увазі потенціювання, чи щось інше?

Проте ці зауваження не знижують загального позитивного враження від дисертаційної роботи, яка є завершеним дослідженням з достатнім рівнем наукової новизни та практичної значущості отриманих результатів.

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

1. Чому при дослідженні анксиолітичної активності похідних триазолобензодіазепінів Ви використали в якості препарату порівняння гідазепам?
2. З якою метою проведено 3D-друк ПЕО гелів, завантажених нановолокнами з сухим екстрактом кропиви собачої трави, модифікованим валіном? Яке відношення має цей екстракт до похідних бензодіазепінів?
3. З якою метою визначали можливу актопротекторну активність сполуки-лідера? Які Вам відомі літературні дані щодо можливої наявності цього виду активності у похідних бензодіазепіну?
4. Чи порівнювали ви дієвість сполуки-лідера у формі субстанції та ПЕО-гелів нановолокна 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну?

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 самостійною закінченою науковою працею, що містить нові, обґрунтовані результати щодо визначення актуальної проблеми фармації. За актуальністю, науковою новизною, обсягом проведених досліджень, ступенем обґрунтованості наукових положень та рівнем впровадження одержаних результатів 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 (із змінами і доповненнями, внесеними постановами Кабінету Міністрів України від 21 березня 2022 року № 341, від 19 травня 2023 року № 502 та від 3 травня 2024 року №507), а її авторка, Боцула Ірина Валеріївна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація».

Опонент:

завідувачка кафедри фармакології
Вінницького національного
медичного університету ім. М. І. Пирогова,
доктор медичних наук, професор

Наталія ВОЛОЩУК