

ВІДГУК

офіційного опонента

**на дисертаційну роботу Щербини Романа Олександровича
«Спрямований синтез, вивчення фізико-хімічних та біологічних
властивостей нових похідних 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-
триазолів», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 17.600.03
при Запорізькому державному медичному університеті
на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук
за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія**

1. Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок з державними і галузевими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки та техніки. Хімія гетероциклічних сполук наразі є однією із провідних галузей у структурі органічного синтезу. Так, частина лікарських засобів на фармацевтичному ринку, що містять в своїй структурі хоча б одне гетероциклічне ядро, перевищує 60%. Така висока популярність обумовлена їх вдалою комбінацією ефективності із широким спектром біологічної дії. Саме тому, цілеспрямований пошук нових біологічно активних речовин (БАР) у ряду гетероциклічних сполук є привілейованим об'єктом досліджень науковців у галузях органічної, медичної та фармацевтичної хімії.

Дисертаційна робота Щербини Романа Олександровича присвячена цілеспрямованому синтезу нових похідних 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів з метою пошуку перспективних біологічно активних сполук.

Різноманітність хімічних та біологічних властивостей похідних 1,2,4-триазол-3-тіонів дозволяє їм зайняти лідируючі позиції у дослідженнях хімії гетероциклів, що робить подальший цілеспрямований пошук ефективних БАР у зазначеному ряду сполук доцільним і актуальним. Тому поглиблене вивчення обраних гетероциклічних систем, їх синтез, дослідження біологічної активності, встановлення взаємозв'язку між структурою і дією представляє безсумнівний інтерес як з теоретичної точки зору розширення комбінаторних бібліотек

біологічно активних сполук, так і в плані спрямованого синтезу потенційних лікарських засобів.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відповідності з планом Вченої ради Запорізького державного медичного університету (протокол № 9 від 28.02.2017р.), і є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи за темами: «Синтез нових біологічно активних речовин – похідних 5-(алкіл-, арил-, гетерил-) похідних 4-R-(аміно)-1,2,4-триазоліл-3-тіонів для створення оригінальних лікарських засобів з анагетичною, актопротекторною, антимікробною, діуретичною та протизапальною дією» (№ державної реєстрації 0115U003470) та «Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості 3,4-дизаміщених 3(5)-тіо-1,2,4-триазолу з антиоксидантною, антигіпоксичною, антимікробною, кардіо- та гепатопротекторною дією» (№ державної реєстрації 0118U007143).

3. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, які викладені у дисертаційній роботі. Головним та принциповим підходом у реалізації задач даного дослідження став раціональний дизайн біомолекул. В його основі полягає поєднання традиційного органічного синтезу та фармакологічного скринінгу.

Дослідження є добре спланованим, особливої уваги заслуговує вдалий вибір вихідних сполук або «структурних блоків», що значно сприяло успішному виконанню роботи та оптимальному проведенню синтетичної частини експерименту. Чітко сформульовані та аргументовані мета роботи і постановка завдання для вирішення цієї мети. На підставі того факту, що дисертант досліджує всі синтезовані сполуки, використовуючи найбільш інформативні та достовірні сучасні фізико-хімічні методи дослідження (ІЧ-, ^1H та ^{13}C ЯМР спектроскопії, рідинну та газову хромато-мас спектрометрії, рентгеноструктурні дослідження, елементний аналіз), структура всіх одержаних сполук не викликають сумнівів. Достовірність одержаних у роботі результатів біологічних досліджень також є безсумнівною, оскільки всі експериментальні дослідження виконані з використанням методик, рекомендованих

фармакологічним комітетом, а отримані результати оброблені з використанням достовірних статистичних методів. Усі наукові положення і висновки, що були сформульовані дисертантом, ґрунтуються на результатах теоретичних та експериментальних досліджень, сформульовані чітко, коректно і лаконічно, є науково обґрунтованими та відповідають змісту наведеного матеріалу. Поставлені в роботі завдання реалізовані повною мірою і на високому науковому рівні.

4. Наукова новизна. Вперше проведено фундаментальне вивчення особливостей будови, фізико-хімічних, біологічних та фармакологічних параметрів в ряду 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів. В ході проведених експериментальних досліджень синтезовано близько 300 нових похідних 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів, будову і індивідуальність яких була підтверджена за допомогою комплексу сучасних фізико-хімічних методів аналізу, а також досліджена їх протимікробна і протигрибкова, аналгетична, антипіретична, діуретична, актопротекторна, антиоксидантна, гепатопротекторна, рістстимулююча, антигіпоксична активності та параметри токсичності.

- вперше розроблено препаративні методи синтезу вихідних 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів, досліджено та оптимізовано реакції алкілювання зазначених сполук н-галогенпохідними.
- алкілюванням 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів 2-хлорацетатною кислотою проведено синтез раніше не описаних в літературі 2-((4-R-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)-ацетатних кислот, для яких проведено дослідження констант іонізації.
- обґрунтовано та реалізовано синтез 1-((4-R-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)пропан-2-онів, 1-(4-флуоро; метоксифеніл)-2-((4-R-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанонів, естерів, амідів, гідразидів та солей 2-((4-R-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетатних кислот як потенційних БАР.
- концептуально сплановано, модифіковано та реалізовано методи синтезу

4-((R-іліден)аміно)-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів, 2-((4-R-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетонітрилів, 2-((4-R-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанамінів.

- вперше проведено синтез ряду N'-(2-((4-R-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозидів та оптимізовано наявні методи циклізації 3-(R)-4-аміно-4*H*-1,2,4-триазол-5-тіонів у відповідні 4-((6-(R)-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіодіазол-5-іл)метил)морфоліни використанням мікрохвильового випромінення.
- структура, індивідуальність, хімічна чистота та фізико-хімічні константи синтезованих сполук встановлені сучасними інструментальними методами аналізу.
- за результатами біологічних випробувань встановлені певні закономірності біологічної дії від хімічної структури сполук. Ідентифіковано високоактивну в фармакологічному плані сполуку-лідера 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти, яку рекомендовано для подальших поглиблених досліджень з можливістю впровадження у ветеринарну, фармацевтичну та медичну практики.
- вперше визначені параметри гострої токсичності сполуки-лідера, досліджені субхронічна токсичність, розраховані показники середньо ефективною та максимально ефективною доз, фармакокінетичні параметри та ідентифіковані можливі метаболіти. Експериментально вивчено вплив сполуки-лідера на біохімічні показники на трьох моделях гепатитів з метою встановлення гепатопротекторної дії.
- вперше розроблено та апробовано лабораторну методику синтезу, технічні умови, проект методів контролю якості, аргументовано та проведено розробку таблетованої лікарської форми потенційної лікарської субстанції з умовною назвою Морфотріл.

Наукова новизна дисертаційної роботи підтверджена 9 патентами України на винахід та 9 патентами на корисну модель.

5. Теоретичне значення результатів дослідження. Дисертантом

проведено комплексні дослідження, які описують аналіз попередніх досягнень в області хімії та фармакології базових структурних блоків з наступною реалізацією цілеспрямованого синтезу нових біологічно активних сполук. Одержані автором результати синтетичних трансформацій мають теоретичне значення в галузях медичної, органічної та фармацевтичної хімії. Сукупність теоретичної частини, експериментального синтетичного матеріалу і даних фармакологічного скринінгу, які представлені у роботі, дозволили запропонувати вирішення важливої проблеми фармації, а саме, на основі таргет-орієнтованого синтезу 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів створена бібліотека БАР та ідентифіковано сполуку-лідера.

6. Практичне значення одержаних результатів. Вперше розроблені препаративні методики синтезу нових 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів, для більшості з яких встановлені параметри гострої токсичності та біологічної дії, що в свою чергу дозволило сформувати кластер закономірностей зв'язку «хімічна структура – біологічна дія», які в майбутньому можуть бути інтегровані науковцями у процес створення потенційних лікарських засобів.

Новітні підходи в процесі дослідження біологічної дії синтезованих сполук дозволили значно розширити синтетичний масив БАР з протимікробними, протигрибковими, аналгетичними, антипіретичними, діуретичними, актопротекторними, антиоксидантними, гепатопротекторними, рістстимулюючими, антигіпоксичними активностями.

Опираючись на результати комплексних фізико-хімічних досліджень та поглиблених фармакологічних випробувань запропоновано потенційний гепатопротекторний засіб Морфотріл, який знаходиться на завершальній стадії доклінічного вивчення. Для вказаної субстанції розроблено та апробовано проект «Методів контролю якості», який висвітлює дані стосовно основних характеристик, методів якісної та кількісної ідентифікації основної речовини та можливих супутніх домішок, належні умови зберігання та граничний термін придатності. У відповідності до вимог чинного законодавства розроблена та

zareestrovana, normativna dokumentacija (tehnicni umovi Ukraini) na kalij 2-
((4-amino-5-(morfolinometil)-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)acetat (chistij).

Splanovano ta provedeno vivcennja specifichnoji aktivnosti, gostroji ta subhronichnoji toksichnosti substanciji Morfotril zgidno z vimoгами metodichnih rekomendacij shodo klinichnogo doslidzennja likarsьkix zasobiv.

Vidibrano optimaljni dopomizhni rечovini, rozrobлено sklad ta tehnologichnu shemu виробництва таблеток потенційної лікарської субстанції Морфотрил методом прямого пресування згідно чинних вимог ДФУ. Проведено визначення стабільності та встановлено термін придатності таблетованої лікарської форми Морфотрил.

Otrimani rezultati sintetichnih transformacij, farmakologichnogo ta biologichnogo skrininiv, vstanovlenih zakonomicnostej зв'язку «ximichna budova – biologichna dia» vprovadzeno v osvithnij ta naukovij proces rjadu medichnih, farmaceutichnih, veterinarних закладів вищої освіти України.

7. Zagaljni vidomosti pro strukturu dissertaciji ta analiz ii змісту. Povnota vikladu osnovnih rezultativ dissertaciji v naukovix faxovix vidannix. Dissertacijna robota vikladena na 494 storinkax tekstu, skladajetsja z anotaciji, vstupu, oglyadu literatury, 6 rozdiliv eksperimentalnih doslidzennj, visnovkiv, spisku vikoristanih dжерел ta 6 dodatkiv. Obсяg osnovnogo tekstu 298 storinok, robota proilюстрована 85 таблицями, 197 рисунками. Spisok vikoristanih dжерел mistit 416 найменувань.

U pershomu rozdilі rozglynuto ta proanalizovano suchasni naukovі publikaciji shodo metodiv sintezu, osnovnih shlyahiv ximichnoji modifikaciji, farmakologichnoji aktivnosti 5*H*(*R*)-4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-tioliv, 5-alkil-4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-tioliv, 5-aril-4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-tioliv, 5-geteril-4-amino-4*H*-1,2,4-triazol-3-tioliv.

U drugomu rozdilі realizovano sintez vихidnih 4-*R*-5-(morfolinometil)-4*H*-1,2,4-triazol-3-tioliv ta ix kalievix i natrivix solej. Slid vidznachiti, sho reakciji alkiluvannja ciklichnimi galogenopohidnimi zdійseno za dopomogou sistemi mikrohvil'ovogo sintezu, v rezultati chogo pidibrani ta optimizovani

умови проведення даної реакції. Вивчено та здійснено синтез 2-((5-(морфолінометил)-4-*R*-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанолів.

У третьому розділі дисертантом отримано ряд 2-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанових кислот. Вперше синтезовано 1-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)пропан-2-они та 1-(4-флуоро; метоксифеніл)-2-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанони шляхом алкілювання 4-*R*-5-(морфоліно-метил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів відповідними α -бромкетонами. Синтез естерів 2-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанових кислот проведено двома методами: прямою етерифікацією 2-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанових кислот відповідними спиртами та алкілюванням тіолів відповідними естерами хлоретанової кислоти. Досліджено синтез амідів та гідразидів 2-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанових кислот за допомогою декількох підходів, що дало змогу встановити найбільш ефективний метод одержання. Вивчені реакції солеутворення 2-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанових кислот з неорганічними та органічними основами, які представляють інтерес як потенційні БАР.

В четвертому розділі реалізовано синтез 4-((*R*-іліден)аміно)-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів. Дисертантом отримано ряд *N*'-(2-((4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетил)ізонікотиногідрозидів. З використанням мікрохвильового синтезу одержано ряд 4-((6-*R*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіодіазол-5-іл)метил)морфолінів.

У п'ятому розділі спрогнозувано біологічні мішені дії 4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів. Досліджено протимікробну та протигрибкову, протитуберкульозну, аналгетичну та антипіретичну, діуретичну, актопротекторну, антиоксидантну, гепатопротекторну та антигіпоксичну дію та гостру токсичність похідних 4-*R*-5-(морфолінометил)-4*H*-1,2,4-триазол-3-тіолів. Встановлено залежності «структура – дія», а також деякі закономірності впливу структури на токсичність.

У шостому розділі визначено гостру та субхронічну токсичність калієвої

солі 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти (Морфотріл). Встановлено гепатопротекторні властивості Морфотрілу на трьох моделях гепатитів (тетрахлорметановий, тетрацикліновий та інфекційний). Розраховано максимально ефективну та середньо ефективну дози Морфотрілу, Проведено дослідження фармакокінетичних показників та визначені потенційно можливі метаболіти Морфотрілу.

У цьому розділі розроблені, апробовані і затверджені лабораторні методики та технічні умови, методи контролю якості на субстанцію Морфотріл. Розроблено технологічну схему виробництва таблеток з діючою речовиною калієвою сіллю 2-((4-аміно-5-(морфолінометил)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанової кислоти методом прямого пресування, проведено визначення стабільності та встановлено термін придатності.

Наукові праці, що висвітлюють зміст роботи, опубліковано у міжнародних та провідних фахових виданнях України. За матеріалами дисертації опубліковано 60 робіт, серед яких 30 статей (28 статей у наукових фахових виданнях України та інших країн, з яких 6 входять до наукометричної бази Scopus, 7 входять до наукометричної бази Web Of Science), 18 патентів України на винахід та на корисну модель, 12 тез доповідей.

Опубліковані роботи повністю відповідають результатам досліджень, достатньо повно та на високому рівні представлені у фахових виданнях та добре характеризують наукові здобутки Щербини Р.О.

8. Зауваження щодо змісту і оформлення дисертації та автореферату, завершеності дисертації в цілому.

В цілому, робота має класичну будову для робіт синтетично-фармакологічного характеру. Вважаю, що завдання, поставлені у дисертаційній роботі Щербини Романа Олександровича, реалізовані повною мірою та на належному рівні. Загальна оцінка роботи *є позитивною*.

Проте, незважаючи на високий рівень дисертаційної роботи Щербини Романа Олександровича, вважаю за необхідне висловити ряд *зауважень та побажань*:

- ✓ в схемах синтезу не завжди коректно відображені валентні кути сполук, хоча отримані дані рентгеноструктурного аналізу дозволяють привести у відповідність геометрії молекул речовин;
- ✓ для підтвердження структури та індивідуальності синтезованих сполук автор використовував два хроматографічні методи аналізу (GS/MS та LC/MS), про те не зрозуміло на яких основах аргументується вибір того чи іншого методу;
- ✓ чому при дослідженні специфічної активності Морфотрілу використано три моделі експериментальних гепатитів (тетрахлорметановий, тетрацикліновий та інфекційний), хоча за більшістю параметрів наближеним до гострого вірусного гепатиту у людей є саме Д-галактозаміновий гепатит?
- ✓ в інтерпретаціях ^1H та ^{13}C ЯМР спектрів не досить детально описано константи спін-спінової взаємодії синтезованих речовин. Бажано було б доповнити роботу результатами 2D ЯМР, так як даний метод аналізу надає більше відомостей про структуру молекули, ніж одномірні ЯМР спектри;
- ✓ в роботі наведені масивні таблиці даних рентгеноструктурних досліджень, які для зменшення переобтяження сприйняття матеріалу було б логічним винести в додатки;
- ✓ в переліку використаних джерел літератури зустрічаються дані, яким понад 10 років;

Наведені зауваження не є принциповими і жодною мірою не впливають на, як вже зазначалось, схвальне сприйняття роботи.

9. Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження на практиці. Розроблені автором препаративні методи синтезу нових груп речовин, встановлені фізико-хімічні параметри синтезованих сполук, а також встановлені закономірності зв'язку «структура-активність» є теоретичним та практичним підґрунтям для подальших наукових досліджень у цьому напрямку. Запропоновані дисертантом підходи до створення нових

біологічно активних агентів можуть бути успішно використані у наукових дослідженнях, які ставлять метою пошук нових перспективних сполук. Результати досліджень впровадити до навчального процесу при викладанні професійно-орієнтованих дисциплін для студентів закладів вищої освіти хімічного та фармацевтичного профілю.

10. Висновок про відповідність дисертації вимогам положення «Порядку присудження наукових ступенів». На основі вищенаведеного можна зробити висновок, що дисертаційна робота Щербини Романа Олександровича «Спрямований синтез, вивчення фізико-хімічних та біологічних властивостей нових похідних 4-R-5-(морфолінометил)-3-тіо-1,2,4-триазолів» є завершеною кваліфікаційною науковою працею, яка вирішує важливі фундаментальні та науково-прикладні проблеми фармації, за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням, ступенем обґрунтованості наукових положень та висновків, повнотою викладу у фахових виданнях повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 р. (із змінами, внесеними згідно з постановами №656 від 19.08.2015 р. і №1159 від 30.12.2015 р., №567 від 27.07.2016 р., №943 від 20.11.2019 р. і №607 від 15.07.2020 р.) та вимогам, які ставляться до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук, за паспортом спеціальності 15.00.02, а її автор **Щербина Роман Олександрович** заслуговує на присудження наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 — фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент:

завідувач кафедри загальної, біонеорганічної, фізикоїдної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького
доктор фармацевтичних наук, доцент

