

ВІДГУК

**офіційного опонента, доктора фармацевтичних наук,
завідувача кафедри загальної, біонеорганічної, фізколоїдної хімії
Львівського національного медичного університету імені Данила
Галицького, доцента Драпак Ірини Володимирівни
на дисертацію Гоцулі Андрія Сергійовича
«Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості в ряду
N- та *S*-заміщених 1,2,4-триазол-3-тіолу, які містять ядро піролу, піразолу,
пурину та ксантину», представлену
на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук
за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія**

1. Актуальність теми дисертації та її зв'язок з державними чи галузевими програмами, пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки

Стрімкий розвиток органічної хімії та фармакології постійно супроводжується відкриттям нових біологічно активних сполук, які знайшли застосування у різноманітних сферах діяльності людини. Серед сполук, які дозволяють застосовувати широкий спектр структурних перетворень основоположне місце займають гетероциклічні структури. Ця група речовин характеризується значним практичним потенціалом щодо хімічних перетворень та дозволяє одержати речовини з великим різноманіттям фармакологічних властивостей. Серед великого різноманіття гетероциклів підвищеним рівнем уваги, як теоретичного так і практичного характеру, наділені похідні 1,2,4-триазол-3-тіолу, що обумовлено їх біологічною значимістю.

Дисертаційна робота Гоцулі А. С. присвячена пошуку нових біологічно активних речовин в ряду *N*- та *S*-заміщених 1,2,4-триазол-3-тіолу, які поєднані в одній молекулі з фрагментами піролу, піразолу, пурину та ксантину. Зазначене поєднання гетероциклів дозволяє, наприклад, більш

виражено впливати на гідрофільно-ліпофільні властивості кінцевих продуктів реакції та підвищувати рівень селективності під час впливу на певний тип рецепторів. Таким чином, актуальність представленої роботи визначається значним практичним потенціалом у створенні оригінальної вітчизняної біологічно активної субстанції.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану НДР Запорізького державного медичного університету «Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості 3,4-дизаміщених 3(5)-тіо-1,2,4-триазолу з антиоксидантною, антигіпоксичною, антимікробною, кардіо- та гепатопротекторною дією» (№ держреєстрації 0118U007143) та згідно з планом держбюджетної НДР (№ держреєстрації 0120U101649) за темою «Синтез, модифікація та дослідження властивостей похідних 1,2,4-триазолу з метою створення антимікробного лікарського засобу», які виконуються в рамках пріоритетного напрямку «Конструювання та технології створення нових лікарських засобів на основі спрямованого дизайну біологічно активних речовин та використання наноматеріалів».

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

Аналіз матеріалів дисертації демонструє, що всі дослідження виконані на достойному науковому рівні з використанням сучасних методів конструювання біоактивних молекул, фізико-хімічних методів аналізу та загальноприйнятих методик фармакологічного скринінгу. Достовірність результатів, які представлені в дисертаційній роботі, не викликає жодних сумнівів, що пояснюється використанням перевірених методів конструювання цільових молекул, сучасних фізико-хімічних методів аналізу та загальноприйнятих методів встановлення фармакологічних та біологічних властивостей синтезованих сполук. Будова всіх синтезованих речовин надійно доведена використанням спектральних методів, елементним аналізом та рентгеноструктурним дослідженням. Висновки, які викладені в дисертаційній роботі, коректні, науково обґрунтовані, логічні та повністю

відповідають змісту дисертаційної роботи. Результати, які були одержані під час дослідження токсичності нових речовин, антимікробної, протигрибкової, протизапальної, аналгетичної, антипіретичної, актопротекторної, гіпоглікемічної та протиракової активності можна вважати надійними та переконливо підтвердженими. У загальних висновках викладені практичні досягнення та наукові положення, які забезпечують вирішення наукової задачі, яка пов'язана з пошуком нових біологічно активних речовин.

3. Новизна дисертаційних досліджень

Наукова новизна представленої роботи полягає в логічно-структурованому використанні різноманітних методів прескринінгового дослідження в ряду сформованої віртуальної бібліотеки 5-гетерилпохідних 1,2,4-триазол-3-тіолу, що дозволило чітко визначитись з напрямками подальшого синтезу цільових молекул як перспективних з біологічної точки зору сполук. Обміркований підхід до фармакологічних досліджень в свою чергу дозволив виявити сполуки-лідери з антимікробною, протизапальною, аналгетичною, антипіретичною, актопротекторною та протираковою активністю. Вперше було одержано результати дослідження *in vitro* та *in vivo* протитуберкульозної активності на двох видах тварин відносно *M. bovis* в ряду 5-гетерилпохідних 1,2,4-триазол-3-тіолу.

До результатів, які мають елементи наукової новизни можна віднести:

1) фармакофорне моделювання та QSAR-аналізу, що дозволило раціонально визначитись з наступним синтезом цільових продуктів реакції;

2) синтез ряду похідних 5-(пірол-2-іл)-4-R-, 5-(5-метилпіразол-3-іл)-4-R-, 5-(пурин-6-іл)-4-етил-, 5-(3-метилксантин-7-іл)-4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу, 5-(1,3-диметилксантин-7-іл)-4-R-, 5-(1,3-диметил-8-морфоліноксантин-7-іл)-4-R-, 5-(3,7-диметилксантин-1-іл)-4-R- та 5-(3,7-диметил-8-піперидиноксантин-1-іл)-4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу, встановлення їх будова та дослідження властивостей;

3) доведення доцільності використання мікрохвильового опромінення під час проведення реакцій естерифікації 2-(4-етил-5-((теофілін-7-іл)метил)-

1,2,4-триазол-3-ілтіо)етанової кислоти одноатомними аліфатичними спиртами;

4) дослідження реакції за участю 2-(4-етил-5-((теофілін-7-іл)метил)-1,2,4-триазол-3-ілтіо)етанової кислоти з гідразидом ізонікотинової кислоти за участю карбонілдімідазолу;

5) дослідження особливостей перебігу реакцій синтезу раніше неописаних 3-*R-N*-феніл-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіазол-6-амінів

6) проведення *in silico* досліджень, які виступили теоретичним підґрунтям для подальшого виконання фармакологічної частини роботи;

7) виявлення за допомогою методів *in vitro* та *in vivo* антимікробної, протигрибкової, протизапальної, аналгетичної, антипіретичної, актопротекторної, гіпоглікемічної та протиракової активностей в ряду 5-гетерилпохідних 1,2,4-триазол-3-тіолу;

8) проведення доклінічних досліджень з вивчення токсичних властивостей сполуки-лідера *N'*-(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-етил-1,2,4-триазол-3-ілтіо)-ацетил)ізонікотиногідразиду на мурчаках та кролях, що дозволяє стверджувати про добру переносимість досліджуваної речовини та відсутність ознак загальнотоксичної дії;

9) розробку проекту МКЯ для активного фармацевтичного інгредієнту *N'*-(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-етил-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетил)ізонікотиногідразиду та реєстрацію ТУ відповідно до чинного законодавства України.

Наукова новизна проведених досліджень підтверджується 11 патентами України на винахід та корисну модель.

4. Теоретичне значення результатів дослідження

Наведені автором дисертаційної роботи результати досліджень мають значне теоретичне значення в галузях фармацевтичної хімії, органічної хімії, фармакології та мікробіології. Заслужовує на увагу також підхід автора до спрямованого синтезу біологічно активних сполук, що важливо для сучасної медичної хімії.

Теоретичне значення запропонованої роботи також полягає в демонстрації механізму вибору фармакологічних моделей *in vivo*, що було зроблено з урахуванням результатів початкових скринінгових досліджень *in silico*. Застосування методів *in silico* надало можливість не просто провести прогнозування з метою попереднього визначення певного типу активності та одержати дані щодо можливого рівня токсичності ще до синтезу, а ще і мінімізувати використання тварин в експериментальних цілях. Дослідження за участю QSAR аналізу надали змогу не лише визначитись з структурними фрагментами, які можуть вплинути на певні види активності, але і дозволили визначитись з рядом кількісних показників, які можуть бути використані у подальших пошуках біологічно активних речовин.

5. Практичне значення результатів дослідження

Методи синтезу, які були запропоновані автором з метою одержання 5-(пірол-2-іл)-4-R-, 5-(5-метилпіразол-3-іл)-4-R-, 5-(пурин-6-іл)-4-етил-, 5-(3-метилксантин-7-іл)-4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу, 5-(1,3-диметилксантин-7-іл)-4-R-, 5-(1,3-диметил-8-морфоліноксантин-7-іл)-4-R-, 5-(3,7-диметил-ксантин-1-іл)-4-R- та 5-(3,7-диметил-8-піперидиноксантин-1-іл)-4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу та їх похідних можуть мати практичне значення під час використання у роботі науково-дослідних лабораторій та інститутів, які пов'язані з синтезом біологічно активних сполук. Висвітлений в роботі алгоритм дій, що безпосередньо пов'язані з встановленням наявності протитуберкульозної активності серед досліджуваних сполук, може бути використаний у практичній діяльності наукових колективів, які займаються розробкою біологічно активних сполук з зазначеним видом активності.

Наукові результати, які було акумульовано під час досліджень, впроваджені в наукову та навчально-методичну роботу ряду вищих навчальних закладів України, що підтверджено відповідними актами.

6. Повнота викладу основних результатів дисертації в наукових фахових виданнях

Матеріали дисертації достатньо повно викладені у 46 публікаціях, з

яких 27 статей (19 – у наукових фахових виданнях України, 3 – у виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus), 6 патентів України на винахід, 5 патентів на корисну модель.

Результати досліджень доповідались на науково-практичних конференціях різних рівнів.

Опубліковані матеріали та результати достатньо повно розкривають та передають зміст дисертаційної роботи, відображають сутність та висновки виконаної роботи.

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

Дисертаційна робота складається із анотацій, списку опублікованих праць, вступу, семи розділів, загальних висновків, списку використаних джерел і 4 додатків (окремою частиною). Дисертаційна робота викладена на 467 сторінках, має обсяг основного тексту 307 сторінок. Робота ілюстрована 77 таблицями, 104 рисунками. Бібліографія включає 295 джерел літератури.

Перший розділ дисертаційної роботи надає детальну та структуровану інформацію, яка пов'язана з аналізом щодо літературних та патентних даних про синтез та структурну модифікацію 5-гетерилпохідних 1,4-триазол-3-тіолу. Критичний аналіз проведеного літературного огляду продемонстрував, що 5-гетерилпохідні 5-R-4-R₁-1,2,4-триазол-3-тіолу широко застосовуються в медичній і ветеринарній практиці як ефективні лікарські засоби і є перспективним класом сполук для пошуку біологічно активних речовин.

Другий розділ надає обґрунтування вибору об'єктів дослідження. На основі застосування ADME-фільтру фізико-хімічних характеристик створеної бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук в ряду 4-R-5-R₁-1,2,4-триазол-3-тіонів та їх похідних (1215 сполук) були визначені структури для подальшого аналізу. Після подальшої фільтрації за критеріями Ліпінського та інших чотирьох фільтрів було відібрано близько 275 сполук, які можуть мати потенційну високу біологічну активність з низькою токсичністю. Також в розділі надана інформація щодо результатів наукових

досліджень, які були спрямовані на синтез та дослідження фізико-хімічних властивостей 5-(пірол-2-іл)-4-R-, 5-(5-метилпіразол-3-іл)-4-R-, 5-(пурин-6-іл)-4-етил-, 5-(3-метилксантин-7-іл)-4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу, 5-(1,3-диметилксантин-7-іл)-4-R-, 5-(1,3-диметил-8-морфоліноксантин-7-іл)-4-R-, 5-(3,7-диметил-ксантин-1-іл)-4-R- та 5-(3,7-диметил-8-піперидиноксантин-1-іл)-4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу та їх похідних. Автором наведені результати досліджень, які були спрямовані на встановлення оптимальних умов реакцій алкілювання за участю галогеналканів, галогенаренів, галогенгетерильних сполук. Крім того, у даному розділі наводиться результат рентгеноструктурного аналізу 5-((пурин-6-іл)тіо)метил)-4-етил-1,2,4-триазол-3-тіолу наряду з обговорення результатів спектрального (^1H , ^{13}C ЯМР спектроскопія) та елементного аналізів всіх синтезованих сполук.

В *третьому розділі* надані результати щодо встановлення оптимальних умов перебігу реакцій алкілювання галогенкетонами 5-гетерилпохідних 1,2,4-триазол-3-тіолу. Зазначений розділ також містить інформацію стосовно методів синтезу, доведення будови та дослідження деяких фізико-хімічних властивостей 2-((5-R-метил-4-R₁-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етан-1-олів та 7-((3-((2-гідрокси-2-R₁-етил)тіо)-4-R-1,2,4-триазол-5-іл)метил)теофіліну. Також автором в рамках даного розділу розглянуто умови перебігу реакцій синтезу 2-((5-R-4-R₁-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)карбонових кислот та встановлений вплив структури галогеновмісної вихідної карбонової кислоти на вихід продукту реакції.

Четвертий розділ дисертаційної роботи присвячений встановленню оптимальних умов та особливостей перебігу реакцій синтезу естерів, амідів та гідразидів 2-((5-R-4-R₁-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанових кислот. В рамках даного розділу також досліджені методи одержання N'-(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-R-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетил)ізонікотиногідразиду. Необхідно відзначити, що автор обрав в якості оптимального методу реакцію взаємодії (2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-R-1,2,4-триазол-3-ілтіо)етанової кислоти з гідразидом ізонікотинової кислоти за участю карбонілдіімідазолу.

П'ятий розділ містить інформацію стосовно умов синтезу та фізико-хімічних властивостей солей 2-((5-R-4-R₁-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)етанових кислот. Даний розділ містить також опис процесу перебігу реакцій одержання іліденгідразидів 2-((5-((теофілін-7-іл)метил)-4-R-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)-етанової кислоти та висвітлює фізико-хімічні характеристики представлених речовин. Також даний розділ привертає увагу дослідженням деяких хімічних перетворень 4-аміно-5-((теофілін-7-іл)метил)-1,2,4-триазол-3-тіолу за участю бензоїлхлориду та ароматичних альдегідів. В подальшому автором описано ряд реакцій циклоконденсації, які супроводжувались одержанням 6-R₁-5-R-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазолів, 3-R-*N*-феніл-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]-тіазол-6-амінів та 6-феніл-3-R-[1,2,4]триазоло[1,3,4]тіадіазинів. Для всіх хімічних перетворень встановлені оптимальні умови перебігу та доведена структура синтезованих речовин.

Шостий розділ містить результати проведених початкових скринінгових досліджень *in silico* за допомогою web-додатку PASS. Віртуальне прогнозування біологічної активності дозволив визначити високоперспективні напрямки подальших досліджень за участю похідних 5-гетерилзаміщених 4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу. Також у даному розділі наведені результати використання програми Swiss Target Prediction, що дозволило точно спрогнозувати біомішені біологічно активних молекул в ряду похідних 5-заміщених 4-R-1,2,4-триазол-3-тіолу на основі комбінації 2D та 3D показників подібності з відомими лігандами. Аналізуючи результати прогнозу біологічної активності визначена найбільш чутлива група ферментів до синтезованих сполук. Далі надана інформація щодо фармакологічної оцінки одержаних сполук та встановлена гостра токсичність синтезованих речовин. Виявлені сполуки-лідери з антимікробною (в тому числі протитуберкульозною), протигрибковою, протизапальною, аналгетичною, антипіретичною, актопротекторною, протираковою активностями.

В *сьомому розділі* наведені результати поглибленого фармакологічного дослідження для сполуки-лідера N' -(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-*R*-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетил)ізонікотиногідразиду. Розділ містить результати дослідження, які підтверджують туберкулостатичну дію сполуки-лідера по відношенню до *M. bovis*. В розділі також наведені результати досліджень токсичності при тривалому введенні досліджуваної сполуки-лідера двом групам лабораторних тварин, відповідно до яких встановлена відсутність дегенеративних змін внутрішніх органів мурчаків та кролів. За результатами дослідження також було відзначено, що застосування N' -(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-етил-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетил)ізонікотиногідразиду є перспективним для лікування тварин, хворих на туберкульоз, ступінь ураження внутрішніх органів лабораторних тварин, заражених патогенним штамом *M. bovis* була значно менше, ніж при лікуванні ізоніазидом. Також у цьому розділі запропоновано проект МКЯ та ТУ на активний фармацевтичний інгредієнт N' -(2-(5-((теофілін-7-іл)метил)-4-етил-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетил)-ізонікотиногідразид.

Автореферат дисертації містить усі наведені в роботі положення, результати досліджень та висновки.

Загальна оцінка роботи є позитивною. Високо оцінюючи рівень дисертаційної роботи, слід проте відмітити деякі зауваження, пропозиції та недоліки:

1) відомим фактом є існування іліденпохідних карбонових кислот у вигляді *E*- та *Z*-ізомерів, чи встановлювали Ви факт існування зазначених видів ізомерів і яким чином Ви це робили;

2) на с. 78 дисертаційної роботи Ви зазначаєте «лужну» гетероциклізацію, поясніть, будь ласка, даний вираз;

3) поясніть, чому в реакціях алкілування Ви застосовуєте завжди виключно натрій гідроксид, а не, наприклад, третинний амін;

4) аналізуючи структуру сполуки **3.52** та її протипухлинну активність до ракових клітин пухлин шийки матки, на Вашу думку, який структурний фармакофор впливає на дану біологічну активність?

5) у роботі зустрічаються невдалі вислови та формулювання, тривіальні хімічні назви.

Наведені недоліки не є суттєвими і не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи Гоцулі А. С., а також на теоретичну та практичну значимість одержаних результатів.

8. Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці

Методики, теоретичні узагальнення кореляції «структура-активність», запропоновані Гоцулею А. С., необхідно використати у дослідженнях наукових груп, які працюють в галузі пошуку нових кандидатів у лікарські засоби. Для синтезованих високоактивних сполук необхідно провести поглиблені доклінічні дослідження. Результати вивчення зв'язку «структура-дія» використати для спрямованого синтезу лікарських засобів в напрямку підвищення ефективності їх дії.

Доцільним є продовження впровадження результатів дослідження, а саме поєднання комп'ютерних та традиційних підходів до пошуку нових лікарських засобів у наукових та навчальний процес для студентів фармацевтичних факультетів.

9. Висновок про відповідність дисертації вимогам положення

На основі всього вищевикладеного можна зробити висновок, що дисертаційна робота Гоцулі Андрія Сергійовича **«Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості в ряду N- та S-заміщених 1,2,4-триазол-3-тіолу, які містять ядро піролу, піразолу, пурину та ксантину»** є завершеною науковою працею і за актуальністю та об'ємом виконаних досліджень, новизною одержаних результатів, їх теоретичним та практичним значенням, ступенем обґрунтованості наукових положень, повнотою викладу у фахових виданнях повністю відповідає вимогам МОН України, «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.) а її автор, **Гоцуля Андрій Сергійович**, заслуговує присудження наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.

Офіційний опонент

Завідувач кафедри загальної, біонеорганічної,
фізколоїдної хімії Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького,
доктор фармацевтичних наук, доцент. . .

І. В. Драпак

