



## ВІДГУК

офіційного опонента – завідувача кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, доктора фармацевтичних наук, професора Логойди Лілії Святославівни на дисертаційну роботу Красовської Наталі Ігорівни на тему “Карбоксилвмісні ([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназоліни та їх функціональні похідні: синтез, фізико-хімічні властивості та протизапальна активність”, подану у спеціалізовану вчену раду ДФ 17.600.056 Запорізького державного медичного університету, що утворена для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 “Охорона здоров'я” за спеціальністю 226 “Фармація, промислова фармація”

**Актуальність теми.** Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗП) є найбільш використовуваними лікарськими засобами для зняття запалення. Їх основна дія полягає в інгібуванні циклооксигенази (ЦОГ), мінімізуючи вироблення простагландинів, які відповідають за реакцію болю та запалення. Більшість НПЗП погано розчиняються у воді, що є головним недоліком, коли передбачається їх введення в гідрофільні матриці, та мають низьку біодоступність. Незважаючи на високу терапевтичну ефективність, НПЗП мають ряд побічних ефектів, таких як гастро-, гепато- та нефро-токсичність. Тому, спрямований пошук нових біологічно активних речовин протизапальної активності, які б були безпечними в застосуванні та мали достатню біодоступність, є актуальною проблемою сучасної фармацевтичної та хімічної науки.

Дисертаційна робота Красовської Н. І. присвячена спрямованому пошуку нових біологічно активних речовин серед карбоксилвмісних хіназолінів, [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів та їх функціональних похідних з використанням методології *in silico*, *in vitro* та *in vivo*, розробці препаративних методик їх синтезу, вивченню фізико-хімічних властивостей та протизапальної активності, встановленню закономірностей «будова-активність». Виходячи з вищенаведеного, представлена дисертаційна робота Красовської Н.І. є, бкзперечно, актуальною.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт Запорізького державного медичного університету за темами: «Спрямований пошук біологічно активних речовин серед анельованих похідних хіназоліну та птеридину» (№ реєстрації 0117U006961; 2017-2021 рр), «Дизайн і синтез конденсованих піримідинів та створення на їх основі потенційних лікарських засобів з протизапальною, нейро- та метаболітотропною дією» (державне фінансування, № реєстрації 0122U000584; 2022-2024 рр).

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі запропоновано узагальнені підходи до спрямованого пошуку нових біологічно активних речовин серед карбоксимісних хіназолінів, [1,2,4]триазоло[1,5-с]-хіназолінів та їх функціональних похідних з використанням методології *in silico*, *in vitro* та *in vivo*, розробки препаративних методик їх синтезу, вивчення фізико-хімічних властивостей та протизапальної активності, встановлення закономірностей «будова-дія», дослідження впливу активних сполук на рівень біомаркерів запалення, окреслення напрямків подальшої структурної модифікації. Авторкою синтезовано 92 сполуки серед карбоксимісних хіназолінів та споріднених гетероциклів, проведено систематизацію даних щодо фізико-хімічних властивостей та протизапальної активності, рекомендовано ряд активних сполук для подальших фармакологічних досліджень.

Авторкою удосконалено препаративні методики синтезу 2-(4(3*H*)-хіназолініліден)гідразидів дикарбонових кислот та їх естерів ацилюванням 4-гідразинохіназоліну ацилгалогенідами, імідазолідами моноестерів дикарбонових кислот або циклічними ангідридами дикарбонових кислот. Вказано особливості їх синтезу в залежності від природи вихідних реагентів, тривалості реакції, каталізаторів та температури.

Авторкою вивчено особливості перебігу реакції гетероциклізації 2-(4(3*H*)-хіназолініліден)гідразидів дикарбонових кислот та їх естерів, як методів синтезу відповідних [1,2,4]триазоло-[1,5-с]хіназолінів, які б містили карбоксильні або етоксикарбонільні «фармакофорні» групи. Зазначено, що даний клас сполук може бути синтезований «*one-pot*» методами, безпосередньою 4-гідразинохіназоліну з ацетил-(пропіоніл-) хлоридами за наявності органічної основи або з циклічними ангідридами у середовищі льодяної оцтової кислоти при тривалому кип'ятінні.

Авторкою вперше розроблено методи синтезу моноестерів (2-(хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідразино-1-карбоніл)бензойних кислот шляхом ацилювання 4-гідразинохіназоліну активованими моноестерами арилдикарбонових кислот, як підхід для формування триазолохіназолінових систем з *o*-(*m*-, *n*-)-карбоксифенільними групами.

Проведено системне дослідження щодо розробки методів синтезу [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-іл)бензойних кислот та їх ефірів за умов реакції гетероциклізації алкіл 2(3-, 4-)-(2-(хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідразин-1-карбоніл)бензоатів та окисної циклізації (хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідразиніліден)-метил)бензойних кислот. Досліджено фактори, що обмежують перебіг гетероциклізації та окисної циклізації та показано, що (хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідразид(гідразон) з *o*-карбоксифенільною групою не утворює трициклічні системи, а за умов перегрупування Дімрота утворюють альтернативні продукти реакції за рахунок наближених нуклеофільних центрів.

Авторкою здійснено модифікацію карбоксильної групи з метою посилення протизапальної активності амінолізом естерів або активованих ([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-іл)алкіл-(арил-)карбонових кислот. Доведено, що найбільш ефективним є аміноліз *N*-ацилімідазолідів (карбонілдіімідазольний метод).

Синтезовані «білдинг-блоки» для розробки синтетичної комбінаторної бібліотеки ароматичних та частково гідрованих 5-моно- та 2,5-дикарбоксилвмісних [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів, а саме 3-R-5-(2-амінофеніл)-1*H*-1,2,4-триазолі, які одержані нуклеофільним розщепленням піримідинового циклу 2-R-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів в умовах кислотного гідролізу.

На основі 3-R-5-(2-амінофеніл)-1*H*-1,2,4-триазолів з використанням «*one-pot/two-step*» та «*one-pot/three-step*» процесів, як стратегії побудови нових гетероциклів, синтезовані 5-заміщені 2-R-5,6-дигідро[1,2,4]триазоло[1,5-с]-хіназоліни, (2-R-5,6-дигідро[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бензойні кислоти, 7-оксо-2-R-6,7-дигідропіроло[1,2-*a*][1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-4*a*-(5*H*)-алканкарбонові кислоти, 2-R-ізоіндоло[2,1-*a*][1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-9(13*bH*)-они та (2-R-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)алканкарбонові кислоти.

Авторкою зроблено детальний аналіз <sup>1</sup>H ЯМР-спектрів, що дало змогу встановити ряд особливостей їх будови, а саме гідразин-гідразонну, гідразид-гідразонну та азол-азольну таутомерію, виявити закономірності розщеплення характеристичних протонів у <sup>1</sup>H ЯМР-спектрах для нових класів синтезованих сполук.

На основі результатів експериментів *in silico*, *in vitro*, *in vivo* авторкою вперше запропоновано методологію пошуку протизапальних агентів, ідентифіковані «структури-лідери» 2.9, 9.1, 10,3 та 12.2, які за силою протизапального ефекту конкурують з еталоном-порівнянні «Диклофенак натрій». Виявлені закономірності «структура-активність» дозволили визначитися з напрямками подальшої структурної модифікації та рекомендувати активні сполуки для поглибленого фармакологічного вивчення.

Наукова новизна проведених досліджень підтверджена патентом України на корисну модель № 142661 від 25.06.2020, Бюл. № 12 «4*a*-R-5,6-Дигідро-[1,2-*a*][1,2,4]триазоло-(тетразоло-)-[1,5-с]хіназолін-7-(4*aH*)-они».

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблені препаративні методи синтезу та виявлені закономірності зв'язку «будова-активність» можуть бути використані для подальшого спрямованого пошуку протизапальних агентів серед карбоксилвмісних хіназолінів, [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів та їх функціональних похідних. Проведене системне дослідження фізико-хімічних властивостей та спектральних особливостей синтезованих сполук є важливим для теорії та практики сучасної медичної та органічної хімії.

Результати досліджень впроваджено в науково-педагогічний процес профільних кафедр закладів вищої освіти України, що підтверджено актами впровадження.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність.** Експериментальні дослідження виконані на високому науковому рівні. Це забезпечено використанням сучасних методів синтезу, великою кількістю повторних експериментальних досліджень, підтвердженням достовірності та коректності результатів відповідними методами математичної статистики. Наукові положення, висновки і рекомендації,

сформульовані в дисертаційній роботі, є достатньо обґрунтованими і достовірними.

**Повнота викладення дисертації в опублікованих працях.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових робіт, з них 3 статті у закордонних фахових наукових виданнях (індексуються базами даних *Scopus* (3 – Q3)), 2 статті у наукових фахових виданнях України, патент на корисну модель України та 12 тез доповідей.

**Оцінка структури та змісту дисертації.** Дисертація оформлена згідно з Вимогами до оформлення дисертації, затвердженими наказом Міністерства освіти та науки № 40 від 12.01.2017 р.

Робота викладена на 223 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», двох розділів експериментальних досліджень, висновків, списку використаних джерел, що містить 197 найменувань (з них 160 іноземною мовою), 3 додатків (65 стор.) та ілюстрована 20 таблицями (додаток А), 65 рисунками.

У **першому розділі** проведено критичний аналіз сучасних підходів до пошуку протизапальних агентів серед заміщених хіназолін-4-онів, 4-амінохіназолінів, конденсованих та спіро-конденсованих хіназолінів. Описано підходи до їх синтезу та показано, що похідні зазначеної гетероциклічної системи мають значний біологічний інтерес і є цікавими для пошуку та створення на їх основі нових протизапальних агентів з різноплановим механізмом дії. Авторкою узагальнено інформацію та чітко зазначено наукову проблему, над якою заплановано працювати.

У **другому розділі** обґрунтовано методи органічного синтезу, визначення чистоти та структури синтезованих сполук з використанням сучасних фізико-хімічних методів, зокрема елементний аналіз, хроматомас-спектрометрія,  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопія. Чітко представлено методологію біологічної частини експериментальних досліджень з використанням методів *in vitro* та *in vivo*, SAR-аналіз. Також надано опис докінгових досліджень та програм, які використовувались.

У **третьому розділі** авторкою проведено узагальнення препаративних методик синтезу 2-(4(3H)-хіназолініліден)гідразидів дикарбонових кислот та їх естерів ацилюванням 4-гідразинохіназоліну ацилгалогенідами, імідазолідами моноестерів дикарбонових кислот або циклічними ангідридами дикарбонових кислот. Показано особливості їх синтезу в залежності від природи вихідних реагентів, тривалості реакції, каталізаторів та температури. Авторкою досліджено особливості перебігу реакції гетероциклізації 2-(4(3H)-хіназолініліден)гідразидів дикарбонових кислот та їх естерів, як методів синтезу відповідних [1,2,4]триазоло-[1,5-с]хіназолінів, які б містили карбоксильні або етоксикарбонільні «фармакофорні» групи.

Вперше розроблено методи синтезу моноестерів (2-(хіназолін-4(3H)-іліден)гідразино-1-карбоніл)бензойних кислот шляхом ацилювання 4-гідразинохіназоліну активованими моноестерами арилдикарбонових кислот, як підхід до формування триазолохіназолінових систем з *o*-(*m*-, *n*-)-карбоксіфенільними групами. Авторкою здійснене системне дослідження щодо

розробки методів синтезу [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-іл)бензойних кислот та їх естерів за умов реакції гетероциклізації алкіл 2(3-, 4-)-(2-(хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідразин-1-карбоніл)бензоатів та окисної циклізації (хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідра-зиніліден)метил)бензойних кислот. Встановлено фактори, що обмежують перебіг гетероциклізації та окисної циклізації. Показано, що (хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідразид(гідразон) з *o*-карбоксіфенільною групою не утворює трициклічні системи, а за умов перегрупування Дімрота утворюють альтернативні продукти реакції за рахунок наближених нуклеофільних центрів.

Досліджено, що гідроліз етил ([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-іл)бензоатів не є препаративним методом для синтезу відповідних кислот. Проведена модифікація карбоксильної групи з метою посилення протизапальної активності амінолізом естерів або активованих ([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-2-іл)алкіл-(арил-)карбонових кислот. Встановлено, що найбільш ефективним та простим у виконанні є амінолізом *N*-ацилімідазолідів (карбонілдіімідазольний метод).

Синтезовані «білдинг-блоки» для створення синтетичної комбінаторної бібліотеки ароматичних та частково гідрованих 5-моно- та 2,5-дикарбоксивмісних [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів, а саме 3-*R*-5-(2-амінофеніл)-1*H*-1,2,4-триазолі, які одержані нуклеофільним розщепленням піримідинового циклу 2-*R*-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів в умовах кислотного гідролізу.

На основі 3-*R*-5-(2-амінофеніл)-1*H*-1,2,4-триазолів з використанням «*one-pot/two-step*» та «*one-pot/three-step*» процесів, як стратегії побудови нових гетероциклів, синтезовані 5-заміщені 2-*R*-5,6-дигідро[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназоліни, (2-*R*-5,6-дигідро[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бензойні кислоти, 7-оксо-2-*R*-6,7-дигідропіроло[1,2-*a*][1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-4*a*-(5*H*)-алканкарбонові кислоти, 2-*R*-ізоіндоло[2,1-*a*][1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-9(13*bH*)-они та (2-*R*-[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)алканкарбонові кислоти.

Будову синтезованих сполук авторкою підтверджена фізико-хімічними методами аналізу, а саме елементним аналізом, <sup>1</sup>H та <sup>13</sup>C ЯМР-спектрометрією, а їх індивідуальність – методом хромато-мас-спектрометрії. Проведений аналіз <sup>1</sup>H ЯМР-спектрів дозволив встановити гідразин-гідразонну та гідразид-гідразонну таутомерію для 2-(4(3*H*)-хіназолініліден)гідразидів дикарбонових кислот, алкіл 2(3-, 4-)-(2-(хіназолін-4(3*H*)-іліден)гідразин-1-карбоніл)бензоатів та азол-азольна таутомерія для (5-(2-амінофеніл)-1*H*-1,2,4-триазол-3-іл)алкіл-(арил-)карбонових кислот.

У **четвертому розділі** представлено результати вивчення біологічних властивостей карбоксивмісних хіназолінів, конденсованих аналогів та споріднених гетероциклів. Результати молекулярного моделювання, ADME-аналізу, токсикометричних параметрів дозволили звузити віртуальну бібліотеку та провести для більшості із них вивчення протизапальної активності. Авторкою ідентифіковано ряд перспективних сполук 2.9, 9.1, 10.3 та 12.2, які за силою протизапального ефекту конкурують з еталоном-порівнянні «Диклофенак натрій» та потребують більш поглибленого вивчення. Авторкою чітко описано

закономірностей «структура-активність». Експериментально доведено, що введення сполук 12.2, 12.3 та 12.6-12.9 при ексудативному запаленні лапки щура, яке викликане введенням карагеніну, є досить ефективним та приводить до суттєвого гальмування запальних процесів. Дві сполуки, а саме сполука 12.2 та 12.3 проявляють протизапальну дію, яка конкурує з диклофенак натрієм. Доведено, що досліджувані сполуки не є інгібіторами ЦОГ-1, ЦОГ-2 та ЛОГ-15, за винятком є 4-(2-(етоксикарбоніл)-5,6-дигідро[1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бензойної кислоти, і, ймовірно, мають інший механізм дії.

Висновки добре сформульовані і відповідають поставленим завданням і змісту дисертаційної роботи.

Під час рецензування дисертації та публікацій здобувачки порушень академічної доброчесності (фабрикації, фальсифікації) виявлено не було.

**Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.** Дисертаційна робота написана сучасною науковою мовою, логічно викладена та добре структурована. Загальна оцінка роботи безумовно є позитивною. Проте поряд з позитивними характеристиками дисертації варто відмітити деякі зауваження:

1. В огляді літератури подекуди відсутні виходи продуктів на схемах.
2. В розділі 2.1 необхідно деталізувати хроматографічні умови.
3. У розділі 3.1 представлено дизайн хімічної частини дисертаційної роботи, проте хотілося б побачити повний дизайн дослідження, включаючи методи *in silico*, *in vivo*, *in vitro* та SAR-аналіз.
4. На мою думку, було б доцільно використати не лише первинні аміни (рис. 3.15), а й вторинні аміни та дослідити вплив одержаних амідів на прояв протизапальної активності.
5. У додатках необхідно уніфікувати представлення десяткового розділювача, оскільки зустрічається і через кому (наприклад, додаток А5), і через крапку (наприклад, додаток А10). Аналогічно зустрічається в тексті дисертаційної роботи (наприклад, 8 загальний висновок).
6. В роботі зустрічаються поодинокі друкарські помилки.

Запитання:

1. Чи плануєте Ви проводити визначення проникності перспективних сполук 2.9, 9.1, 10.3, 12.2 та встановлення їх приналежності до класу БСК?
2. У чому полягає принципова перевага запропонованих Вами речовин перед диклофенаком?

Наведені зауваження і запитання носять характер наукової дискусії і жодним чином не впливають на високу оцінку дисертаційної роботи.

**Рекомендації щодо використання результатів дослідження.** Розроблені авторкою препаративні методи синтезу та виявлені закономірності зв'язку «будова-активність» можуть бути застосовані для подальшого спрямованого пошуку протизапальних агентів серед карбоксилвмісних хіназолінів, [1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназолінів та їх функціональних похідних. Дослідження фізико-хімічних властивостей та спектральних особливостей синтезованих сполук

можуть бути використані в теорії і практиці сучасної медичної та органічної хімії. Рекомендації щодо найбільш активної сполуки можуть бути застосовані фармакологами для проведення подальших досліджень.

**Висновок.** За результатами аналізу дисертаційної роботи Красовської Наталі Ігорівни на тему “Карбоксилвмісні ([1,2,4]триазоло[1,5-с]хіназоліни та їх функціональні похідні: синтез, фізико-хімічні властивості та протизапальна активність”, наукових публікацій, в яких висвітлені основні її положення, можна зробити висновок, що за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, практичною значимістю, ступенем обґрунтованості наукових положень та висновків вона 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 Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, а її автор, Красовська Наталя Ігорівна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 “Фармація, промислова фармація” галузі знань 22 “Охорона здоров’я”.

**Офіційний опонент:**

завідувач кафедри фармацевтичної хімії

Тернопільського національного медичного університету

імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

доктор фармацевтичних наук, професор

Лілія ЛОГОЙДА

Особистий підпис

заступник ректора з кадрових питань  
Тернопільського національного  
медичного університету



На електронний документ накладено: 1 (Один) підписи чи печатки:  
На момент друку копії, підписи чи печатки перевірено:  
Програмний комплекс: eSign v. 2.3.0;  
Засіб кваліфікованого електронного підпису чи печатки: ПТ Користувач ЦСК-1  
Експертний висновок: №05/02/02-1424 від 05.04.2016;  
Цілісність даних: не порушена;



Підпис № 1 (реквізити підписувача та дані сертифіката)  
Підписувач: Логойда Лілія Святославівна 3187501324;  
Належність до Юридічної особи: ;  
Код юридичної особи в ЄДР: 3187501324;  
Серійний номер кваліфікованого сертифіката: 3ED5083160DBC59B040000006777730061ECD700;  
Видавець кваліфікованого сертифіката: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг;  
Тип носія особистого ключа: Захищений;  
Тип підпису: Кваліфікований;  
Сертифікат: Кваліфікований;  
Час та дата підпису: 14:20 04.03.2023;  
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для даних від АЦСК (кваліфікованого надавача електронних довірчих послуг)