

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Косінської Ганни Павлівни «Структурні фактори молекул, що визначають їх здатність проникнення через гематоенцефалічний бар'єр», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01 при Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Актуальність теми. Для функціонування клітин, тканин і органів необхідно постійне надходження до них речовин з крові і виведення продуктів метаболізму, а також, крім цього, необхідний постійний захист від дії шкідливих і токсичних речовин. Одним з важливих тканинних бар'єрів є гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), якому приділяється найбільша увага у вивченні будови, функціональних властивостей, зміни бар'єрних показників. Вивчення проникності крізь ГЕБ необхідно як для створення нових лікарських засобів, для яких центральна нервова система (ЦНС) є біомішенню, так і для розробки ефективних шляхів терапії захворювань головного мозку (хвороби Альцгеймера і Паркінсона, раку мозку, інсульту та ін.). Специфічність ГЕБ з фізіологічної точки зору являє собою надійний захист для тканин мозку, але в клінічному плані така вибірковість знижує ефективність проведеної медикаментозної терапії при різних захворюваннях ЦНС.

Можливість прогнозування параметрів проникнення речовин через ГЕБ може суттєво раціоналізувати пошук зазначених вище специфічних лікарських засобів. Для вирішення таких завдань методи *in silico*, зокрема QSAR/QSPR, є найбільш прийнятними.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася у рамках досліджень Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України відповідно до наступних тем: «Синтез, структура, властивості та молекулярне розпізнавання центральними та периферичними рецепторами біологічно активних гетероциклічних сполук та

пептидоміметиків» (№ державної реєстрації 0107U001300, 2007 - 2011² pp.), «Структура, селективність зв'язування з біомішенями та активність сполук, які мають нейротропну, імунотропну та антитромботичну активність» (№ державної реєстрації 0112U003037, 2012 - 2016 pp.), «Синтез, структура, властивості та молекулярні механізми для нових антитромботичних та противірусних засобів» (№ державної реєстрації 0117U004134, 2017 - 2021pp.).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше сформовано та верифіковано базу даних, що складається з 614 різноманітних сполук, і яка містить інформацію щодо таких показників, як: 1) LogBB (blood-brain, $\log(C_{\text{мозок}}/C_{\text{кров}})$) – логарифм відношення концентрації речовини, що досліджується, у головному мозку і плазмі крові при досягненні системою стаціонарного стану; 2) LogPS – логарифм добутку проникності і площі поверхні обміну, що є мірою перенесення сполуки з крові у мозок та відображує ступінь проникнення речовини у мозок без відносного зв'язування з білками; 3) $\text{LogP}_0^{\text{РАМРА-ВВВ}}$ – логарифм пасивної проникності, отриманий за допомогою методу РАМРА (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), в основі якого лежить використання штучних небіологічних мембран; 4) належність речовини до класу ВВВ+ або ВВВ-, тобто проникає речовина через ГЕБ, чи не проникає; 5) є сполука субстратом Р-глікопротеїну, чи ні.

На основі сформованої бази окремо для кожного показника було згенеровано навчальні вибірки для побудови QSAR моделей. Уперше для вирішення завдань відносно проникнення речовин через ГЕБ використано підхід на основі симплексного представлення молекулярної структури.

Розраховано низку симплексних (фрагментних) дескрипторів, вершини яких диференційовано не тільки за природою атомів, але і за різними атомними властивостями: частковими зарядами, ліпофільністю, електронною поляризуємістю, електронегативністю, здібністю бути донором/акцептором потенційного водневого зв'язку, параметрами ван-дер-ваальсових взаємодій.

На основі розрахованих дескрипторів побудовано низку адекватних QSAR моделей для оцінки параметрів проникнення речовин через ГЕБ – LogBB,

LogPS, $\text{LogP}_0^{\text{PAMPA-BBB}}$, належність до класу BBB+ / BBB-, субстрат³ Р-глікопротеїну/ несубстрат. Для всіх моделей оцінено стабільність (robustness) та прогностичну здатність, і проаналізовано області застосовності побудованих моделей. Проведено фізико-хімічну та структурну інтерпретацію побудованих QSAR моделей. Застосовано універсальний методичний підхід для оцінки впливу окремих структурних фрагментів на досліджувану властивість. Здійснено порівняльний аналіз впливу структурних та фізико-хімічних факторів для усіх показників проникнення через ГЕБ, оцінено баланс полярних та неполярних чинників.

Вперше створено експертну систему, в яку ввійшли QSAR моделі, побудовані при вирішенні завдань даної дисертаційної роботи для прогнозування різноманітних показників проникнення органічних речовин через ГЕБ.

Публікації та автореферат повністю відображають основний зміст роботи. Оформлення роботи та автореферату відповідає вимогам Державних стандартів України.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дисертаційної роботи визначають шляхи структурної модифікації речовин для реалізації можливостей проникати ГЕБ. Побудовано адекватні QSAR моделі, що увійшли до складу експертної системи «AcrossBBB» для позаекспериментального скринінгу речовин щодо проникнення через ГЕБ. Експертна система розрахована на широке коло фахівців, має зручний, інтуїтивно зрозумілий інтерфейс, являє собою програмне забезпечення, що сумісне з операційними системами Windows і Linux.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті. За матеріалами дисертаційної роботи опублікована 21 наукова праця, із них: 1 глава монографії видавництва Springer, 3 статті у наукових закордонних виданнях (ці 4 публікації включено до наукометричної БД Scopus), 1 стаття в українському фаховому виданні та 16 тез доповідей на міжнародних і українських конференціях.

Аналіз дисертаційної роботи. Структура та обсяг дисертації.

Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, бібліографії та двох додатків. Робота викладена на 178 сторінці (з них 144 – основний текст і 34 – додатки), містить 15 таблиць, 24 рисунки, список використаної літератури з 135 найменувань.

Дисертаційна робота оформлена акуратно. Матеріал роботи викладено послідовно, доступно і проілюстровано рисунками, таблицями. Застосована в роботі наукова термінологія є загальноновизнаною, стиль викладення результатів теоретичних і практичних досліджень, нових наукових положень, висновків і рекомендацій забезпечує доступність їх сприйняття та використання.

В першому розділі (огляд літератури „Гематоенцефалічний бар’єр та дослідженні проникнення речовин через нього”) автор послідовно і критично аналізує стан літератури до 2020 року, щодо піднятої наукової проблеми, акцентує увагу на перспективах розвитку ефективних методів оцінки проникнення речовин через ГЕБ, досить актуальною є необхідність надійних методів його прогнозування *in silico* для нових структур у ході пошуку і оптимізації сполук - лідерів. Даній проблемі присвячено багато досліджень з використанням методів хемоінформатики, проте моделі, які представлені в літературних джерелах, не володіють достатньо широкою областю застосовності і високою точністю прогнозування проникнення ГЕБ для різноманітних органічних сполук, мають локальний характер, в них вивчаються окремі показники проникнення речовин через ГЕБ, здатність до прогнозу обмежена структурно чи функціонально однорідними вибірками сполук, що використовувались при побудові цих моделей.

В цілому огляд побудований на вдало класифікованому і значному фактичному матеріалі, формуючи враження про дисертанта як кваліфікованого дослідника. Дисертант показав, що дослідження в даному напрямку є виправданими та актуальними.

Другий розділ присвячен методології рішень побудови QSAR моделей «структура – показники проникнення через ГЕБ», фізико-хімічної і структурної інтерпретації моделей, які були проведені на основі симплексного представлення молекулярної структури (СПМС), у рамках якого кожна молекула

представляється у вигляді системи різних симплексів – чотириатомних⁵ молекулярних фрагментів фіксованої будови та топології

Для генерації симплексних дескрипторів в даній роботі використовували 2D-моделі молекул (структурні формули).

В рамках моделей СПМС можна визначити відносний вплив різних фізико-хімічних чинників на характер прояву властивості, що вивчається. Відносний внесок симплексів, в яких атоми диференційовані за ліпофільністю, відображує роль гідрофобних чинників, відносний внесок симплексів, в яких диференціація вершин відповідає зарядам на атомах, певною мірою, відображує роль електростатичних чинників тощо.

Після побудови QSAR моделей при використанні симплексних дескрипторів можна визначити відносний кількісний внесок різноманітних структурних фрагментів, що впливають на активність.

В результаті систематизації та узагальнення літературних даних стосовно проникнення речовин через ГЕБ сформовано і верифіковано базу даних з відомими для органічних сполук показниками проникнення ГЕБ. Всього було включено до бази 614 сполук, що належать до різних хімічних класів, зокрема різноманітні вуглеводні, галогенопохідні, етери, естери, спирти, різноманітні карбонільні сполуки, нітрогенвмісні речовини, тощо. Біля 85% складають поліфункціональні сполуки, більшість з яких є лікарськими засобами.

Попередню обробку даних проводили з використанням підходів «data curation». Для всіх 614 досліджуваних молекул зібраної бази даних було розраховано 15745 2D симплексних дескрипторів, зважених за різними атомними властивостями. Для того щоб встановити зв'язок між структурою та властивостями в даній роботі використовувалися наступні методи машинного навчання. Першим методом є метод PLS, який добре зарекомендував себе при роботі з великими масивами структурної інформації, оскільки ґрунтується на перетворенні великої кількості структурних параметрів в невелику кількість прихованих (латентних) змінних. Другим методом є метод випадкового лісу, використовуючи який можливо вирішувати як класифікаційні, так і регресійні задачі. Модель випадкового лісу являє собою ансамбль окремих дерев рішень.

Для оцінки якості побудованих моделей найбільш поширеними є показники коефіцієнт детермінації і середньоквадратична помилка. Показано, що в залежності від типу вибірки можна оцінити описувальну та прогнозирующую здатності моделей.

В наступних розділах наведено результати виконаних досліджень. В *третьому розділі* досліджено QSAR аналіз впливу структурних факторів на проникнення через ГЕБ. Завдяки використанню симплексного підходу для 2D моделей молекул та методів машинного навчання PLS та RF побудовано адекватні QSAR моделі для таких показників проникності через ГЕБ, як: LogBB, LogPS, LogP₀^{PAMPA-BBB}. Прогностична здатність цих моделей оцінена на рівні 61-82%. Узагальнюючи результати даних по всім трьом вибіркам, можна стверджувати, що сприяють проникненню речовин крізь ГЕБ ароматичні, алкільні фрагменти, галогени тощо. Перешкоджають – наявність в молекулах іонізованих груп, а також донорів-акцепторів потенційного водневого зв'язку. Аналіз фізико-хімічних чинників для всіх цих вибірок показав, що найбільш впливовими є електростатичні і гідрофобні взаємодії.

Представлено баланс полярних і неполярних взаємодій, який істотно змінюється в низці: LogBB - LogPS - LogP₀^{PAMPA-BBB}. Враховуючи особливості формування модельної системи PAMPA (штучні мембрани) стає зрозумілим, чому в цьому випадку вирішальну роль грають гідрофобні взаємодії

Два таких протилежних фактора, як ліпофільність молекул (неполярний фактор) і розчинність їх у воді (полярний фактор + водневі зв'язки), будуть в значній ступені визначати проникнення сполук через ГЕБ. Також, скориставшись, розробленими раніше експертними системами для прогнозування ліпофільності органічних речовин (LogP) і їх водної розчинності (LogSw) були розраховані ці показники для всіх 614 молекул зібраної бази даних

Приведені контурні діаграми залежностей LogBB= f(LogP, LogSw), LogPS = f(LogP, LogSw), LogP₀^{PAMPA-BBB} = f(LogP, LogSw) демонструють, що для сполук з високою проникаючою здатністю крізь ГЕБ співвідношення між ліпофільністю і водною розчинністю повинні бути приблизно такі: $3 \leq \text{LogP} \leq 6$; $-5 \leq \text{LogSw} \leq -1$.

Для показників BBB+/- (K1(G4)), субстратів та не субстратів Р-глікопротеїну

(K2(G5)) побудовано якісні класифікаційні моделі з задовільною ⁷якістю прогнозування. Для навчальних вибірок ці моделі забезпечують безпомилкову класифікацію. Кількісно оцінені загальні тенденції класифікації молекул повної вибірки (614 сполук) по моделям K1(G4) та K2(G5). Таку оцінку для класифікаційних даних можна отримати за допомогою знакового коефіцієнту асоціації (КА). Розрахована величина $KA = -0.35$ свідчить про антибатний характер зв'язку цих двох класифікацій, що цілком зрозуміло - речовини, які є субстратами Р-глікопротеїну не можуть проходити крізь ГЕБ. За представленими розрахунками цей факт виконується в 92% випадків (8% - помилка прогнозу). Невелика абсолютна величина КА також зрозуміла - безпосередньо пов'язані тільки класи: 1 (+) - субстрати Р-глікопротеїну і 0 (-) речовини не проникаючи крізь ГЕБ. Для інших випадків поєднання класів може бути довільним.

У *четвертому розділі* описана експертна система – це комп'ютерна програма, яка здатна замінити фахівця-експерта при вирішенні проблемної ситуації. Особливого поширення експертні системи отримали при використанні статистичних інтелектуальних моделей.

QSAR моделі, які були отримані при вирішенні завдань даної дисертаційної роботи, були об'єднані в єдину експертну систему “AcrossBBB”, що являє собою програмне забезпечення з візуальною оболонкою, сумісним з операційними системами Windows і Linux.

Експертна система розрахована на широке коло фахівців і має зручний, інтуїтивно зрозумілий інтерфейс. Як вхідна інформації використовуються файли: *.mol, *.ml2 або *.sdf, що містять структурні параметри молекул, які призначені для прогнозу показників проходження їх через ГЕБ. Після розрахунку дескрипторів для цих сполук на основі розроблених QSAR моделей оцінюються цільові показники: LogBB, LogPS, $\text{LogP}_0^{\text{PAMPA-BBB}}$, BBB +/-, P-gl (0/1) з ідентифікацією приналежності до відповідних “applicability domain”. Результати прогнозу можуть бути переглянуті як в основному вікні програми, так і у вигляді текстового файлу з роздільниками для подальшого використання в розрахунках, або як референтні дані.

Зауваження та загальна оцінка роботи. Робота містить багато пізнавального матеріалу, написана гарною українською мовою, добре вчитана, має мінімальну кількість друкарських помилок. Необхідно зазначити, що наукові положення, висновки, практичні рекомендації, які сформульовані в дисертації цілком обґрунтовані і не викликають сумнівів.

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

- На жаль, у дисертаційній роботі не було проаналізовано вплив розміру молекул на ступінь їх проникнення через гематоенцефалічний бар'єр;

- На думку автора, який зв'язок існує між біодоступністю та нейродоступністю?

- На скільки корелюють між собою різні показники проникнення речовин через ГЕБ?

- На скільки доцільне використання більш складних 3D-4D QSAR моделей для прогнозування параметрів проникнення речовин через ГЕБ ?

Ці зауваження не торкаються основних досягнень дисертаційної роботи, яка оформлена у відповідності з діючими вимогами.

Відповідність дисертації п.11 «Порядку присудження наукових ступенів».

На підставі вищевикладеного вважаю, що представлена дисертаційна робота Косінської Ганни Павлівни «Структурні фактори молекул, що визначають їх здатність проникнення через гематоенцефалічний бар'єр», є закінченою науково-дослідною роботою і за актуальністю тематики, обсягом виконаних досліджень, новизною отриманих результатів, ступенем обґрунтованості наукових положень і рекомендацій, повнотою викладення результатів роботи у фахових виданнях теоретичним і практичним значенням відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 року зі змінами внесеними згідно з постановою КМУ №656 від 19.09.2015р., №1159 від 30.12.2015р., та №567 від

27.07.2016р, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її авторка⁹
Косінська Ганна Павлівна заслуговує присудження ступеня кандидата біологічних
наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Завідувачка кафедри органічних і
фармацевтичних технологій
Державно університету
«Одеська політехніка» МОН України,
Д. біол. н, проф.

Кравченко І.А.

Підпис проф. Кравченко І.А. завіряю
Проректор з наукової роботи
Державного університету
«Одеська політехніка», професор



Дмитришин Д.В.