

СПЕЦІАЛІЗОВАНА ВЧЕНА РАДА ДФ 35.246.004

**Інституту біології клітини НАН України
УХВАЛИЛА:**

**рішення спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії**

Спеціалізована вчена рада Інституту біології клітини Національної академії наук України, м. Львів

(повне найменування закладу вищої освіти (наукової установи), підпорядкування (у родовому відмінку), місто)

прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії галузі знань 09 - Біологія
(галузь знань)

на підставі прилюдного захисту дисертації «Антінеопластична дія нових похідних тіазолу і тіазолідинону та їх водорозчинних форм»

(назва дисертації)

за спеціальністю 091 - Біологія

(код і найменування спеціальності відповідно до Переліку галузей знань і спеціальностей, за якими здійснюється підготовка здобувачів вищої освіти)

"25" вересня 2023 року.

Івасечко Ірині Ігорівні, 1993 року народження,

(прізвище, ім'я, по батькові (у разі наявності) здобувача)

громадянка України

(назва держави, громадянином якої є здобувач)

освіта вища: закінчила у 2017 році Львівський національний університет імені Івана Франка

(найменування закладу вищої освіти)

за спеціальністю Генетика

(за дипломом)

Навчається в аспірантурі в Інституті біології клітини Національної академії наук

України, м. Львів

(посада, місце основної роботи, відомче підпорядкування, місто)

з 2017 р. до цього часу.

Дисертацію виконано в Інституті біології клітини Національної академії наук України,

м. Львів

(найменування закладу вищої освіти (наукової установи), підпорядкування, місто)

Науковий керівник Стойка Ростислав Стефанович

(прізвище, ім'я, по батькові (у разі наявності),

доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України, Інститут біології клітини Національної академії наук України, завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу.

(науковий ступінь, вчене звання, місце роботи, посада)

Здобувач має чотири наукових публікацій за темою дисертації у періодичних наукових виданнях інших держав, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus:

1. Lozynskyi, A., Zimenkovskyi, B., **Ivasechko, I.**, Senkiv, J., Gzella, A., Karpenko, O., ... & Lesyk, R. (2019). Synthesis and cytotoxicity of new 2-oxo-7-phenyl-2, 3-dihydrothiazolo [4, 5-b] pyridine-5-carboxylic acid amides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 194(12), 1149-1157. <https://doi.org/10.1080/10426507.2019.1633318>. IF=1,046, Q4.
2. **Ivasechko, I.**, Yushyn, I., Roszczenko, P., Senkiv, J., Finiuk, N., Lesyk, D., Holota, S., Czarnomysy, R., Klyuchivska, O., Khyluk, D., Kashchak, N., Gzella, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Development of Novel Pyridine-Thiazole Hybrid Molecules as Potential Anticancer Agents. *Molecules*, 27(19), 6219. <https://doi.org/10.3390/molecules27196219>. IF= 4,927, Q2.
3. Lozynskyi, A., Senkiv, J., **Ivasechko, I.**, Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., ... & Lesyk, R. (2022). 1, 4-Naphthoquinone Motif in the Synthesis of New Thiopyrano [2, 3-d] thiazoles as Potential Biologically Active Compounds. *Molecules*, 27(21), 7575. <https://doi.org/10.3390/molecules27217575>. IF= 4,927, Q2.
4. **Ivasechko, I.**, Lozynskyi, A., Senkiv, J., Roszczenko, P., Kozak, Y., Finiuk, N., Klyuchivska, O., Kashchak, N., Manko, N., Maslyak, Z., Lesyk, D., Karkhut, A., Polovkovych, S., Czarnomysy, R., Szewczyk, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Khyluk, D., Gzella, A., Bielawski, K., Stoika, R., Lesyk, R. (2023). Molecular design, synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 252, 115304. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115304>. IF= 7,088, Q1.

У дискусії взяли участь голова і члени спеціалізованої вченої ради та присутні на захисті фахівці:

Голова ради – Гончар М. В., доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України. *Оцінка позитивна із запитаннями та зауваженнями:*

1. Які методи ви використовували для контролю чистоти досліджуваних сполук?
2. Чи досліджували ви гіпоглікемічні властивості цих сполук?

Правильно вживати слово замісник, а не радикал.

Рецензент – Стасик О. В., доктор біологічних наук, старший дослідник, завідувач відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України, *надав позитивну рецензію із зауваженнями та запитаннями:*

1. Чи могли б ви пояснити з чим пов'язаний вибірковий вплив досліджуваних сполук на пухлинні та псевдо-нормальні клітини?
2. Анотація. «рак є четвертою основною причиною смерті у віці до 70 років у 23 країнах світу, і, ймовірно, стане першою у цілому світі до 2060 році. (~19 млн смертей очікується) [1].» - Відомо, що рак є другою причиною смерті, після серцево-судинних захворювань, потрібно перефразувати.
3. «Інгібітори PARP є також важливими у розвитку концепції синтетичної летальності, як підходу до лікування раку.» Потрібно пояснити, чому інгібітори PARP діють селективно на

пухлинні клітини, і в чому суть так званого підходу «синтетичної летальності». Суть власне підходу СЛ та PARP як мішенні пояснено лише на стор. 41 Огляду літератури.

4. Після Анотації необхідно додати перелік умовних позначень, використаних у роботі. Варто також для зручності подати прип'євку згадуванні англійські назви спротипухлинних сполук із відповідними англійськими абревіатурами, поряд з українськими.

5. Вступ. «препаратів, таких як тіазофурин (інгібітор дегідрогенази IMP), дазатиніб (інгібітор тирозинкінази Bcr-Abl),...» - Подати також англійські назви сполук.

6. Огляд літератури. Зауваги запропоновано у тексті розділу.

7. Результати. Опис піридин-тіазолові гібридів як протипухлинних сполук та взаємовідношення «структура-функція» можливо варто перенести до Огляду літератури.

8. Рисунки 4,5,6, 8 - збільшити масштаб.

9. Рис. 11 Незрозуміло, що є контролем у даному випадку. – пояснити. Те ж стосується Рис. 29.

10. Таблиця 5 стор 79 – дані моделювання докінгу *in silico* ще не свідчать про безпосередню взаємодію досліджуваних сполук із білком PARP, потрібно вживати слово «вірогідно», чи «імовірно».

11. Рис. 16. Вестерн blot аналіз білків, пов'язаних із відповіддю клітини на пошкодження ДНК та індукцію апоптозу протягом 48 та 72 годин інкубації із сполукою Les-6485 у концентрації 2.5 та 5 мкМ.

12. Запитання: Чи не є спостережена відповідь (лише на 72 год) занадто пізною? Варто було б мати контроль з УФ-обробленими клітинами.

13. Рис. 17. де подівся третій графік? Потрібно модифікувати у чорно-білому варіанті чи додати пояснення щодо співпадіння із контролем.

14. Аналіз та узагальнення результатів. Варто спробувати проаналізувати, виходячи із відповідних структур, чому саме сполуки 10 та 19 є потенційно активнішими спротипухлинними агентами, ніж подібні перевірені аналоги.

15. Висновки. Потрібно відредагувати, та на мій погляд скоротити ряд розлогих висновків, таких як №2.

16. Назва роботи: дискусійне запитання: Чи варто залишати у назві «ТА ІХ ВОДОРОЗЧИННИХ ФОРМ», оскільки власне питання водорозчинності мало чи недостатньо обговорюється у результатах та їх аналізі. І чи не варто додати до назви слово «Механізми дії», бо власне їх встановлення і є основним вислідом роботи. Тобто пропонується така назва: «Механізми антineопластичної дії нових похідних тіазолу і тіазолідинону» .

17. Загальне зауваження: У тексті роботи потрібно додати цілий ряд так званих crossreference себто покликів на рисунки та розділи дисертації, де обговорювані дані представлені. Це стосується Обговорення результатів, Огляду літератури та інш. розділів.

18. Запитання: У роботі наводиться висновок, що «сполуки ряду похідних тіопірано-тіазолів з нафтохіоновим фрагментом електростатично та/або за типом інтеркаляції взаємодіють із ДНК, проте рівень їхньої взаємодії не корелює із цитотоксичною активністю». Чи тут немає певної суперечності, і як можна таке спостереження пояснити?

19. Споріднене запитання: деякі із досліджуваних сполук виявилися більш селективними щодо пухлин, деякі цитотоксичними для усіх клітин. Чи спостерігалась певна закономірність щодо їх структурних особливостей.

Рецензент – Вовк О. І., кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник відділу сигнальних механізмів клітини, Інститут біології клітини НАН України, надала позитивну рецензію із зауваженнями та запитаннями:

1. У тексті дисертаційної роботи є граматичні і синтаксичні помилки та одруки, які потребують виправлень.

2. Назви дослідних речовин та показників у роботі слід уніфікувати та розшифровувати їх при першому згадуванні у тексті. Зокрема, трапляються абревіатури без пояснення, є кілька варіантів написання назви флюзапаріб.

3. На багатьох рисунках та у таблицях потрібно замінити англомовні підписи і вказати розміреності одиниць.

4. Зустрічаються не зовсім вдалі терміни та формулювання, ймовірно, як результат дослівного перекладу з англійської мови, які варто відкоригувати.

5. Експериментальні умови, представлені на рис.6 аж у 10 репрезентативних зображеннях морфологічних змін клітин після інкубації з досліджуваними чинниками, дуже побіжно описані лише у самому тексті дисертації і відсутні в підписі, що дуже утруднює сприйняття. Також складно ідентифікувати багатоядерні гіантські клітини. Те ж саме стосується і всіх інших рисунків із мікрофотографіями забарвлених клітин.

6. До рисунку 9 варто додати репрезентативні фотографії ДНК комет, які аналізувалися в ході досліду, що додало б наочності лише графічному представленню результатів.

7. На рис. 14 є неузгодженість між числовими даними концентрацій легенди, осі x та описом у тексті, а також відсутній стовпчик даних по флюзапарібу при концентрації 5 мкМ.

8. На рис. 16 слід вказати молекулярні маси досліджуваних Вестерн-блот аналізом білків.

9. Оскільки експериментальна частина дисертаційної роботи містить два розділи досліджень різних груп похідних тіазолу (а саме 3.1 та 3.2), в яких використовувалися аналогічні методи, зустрічається певне дублювання тексту, зокрема щодо експериментів *in vivo* у випадку введення доксорубіцину як контролю. Подібна ситуація і у випадку дослідження протипухлинної активності сполук *in vitro* в рамках протоколу Національного інституту раку (США).

10. Відсутній логічний ланцюжок пояснення, чому із дуже чисельної панелі пухлинних клітин для дослідження похідних піридин-тіазолів обрано саме лінію MCF-7, на якій було проведено клоногенний тест, а згодом дослідження здатності до флуоресценції, а морфологічні зміни, індуковані новими похідними піридин-тіазолу, аналізувалися уже на лінії KB3-1? Таке ж питання виникає і у випадку другої групи речовин - тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом, де використовувалася уже лінія MDA-MB-231.

11. Деякі окремі невеликі рисунки, зокрема у розділі 3.2.4, які представляють результати вимірювань проточною цитометрією активності ініціюючих каспаз 8 і 9 та ефекторних 3 /7 (рис. 27, 30 та 31, відповідно), можна об'єднати в один, що спростила аналіз і дещо структурує дисертаційну роботу.

12. Розділи 3.2.2 та 3.2.7 містять лише результати, отримані в ході досліджень, потрібно додати їх обговорення та висновок.

13. Вам показано, що попередня інкубація клітин MCF-7 з інгібітором PARP1 знижує більш ніж у 3 рази їх чутливість до молекули Les-6485. Чим, крім констатованого у роботі факту, міг бути спричинений такий ефект?

14. Розділ 3.1.10. Інгібування PARP1 в клітинах лінії MCF-7. “Інгібування PARP1 *in vitro* досліджували, попередньо проінкубувавши клітини MCF-7 з флюзапарібом”. Чи використовувався флюзапаріб у роботі в інших експериментах як позитивний контроль для порівняння дії із дослідженням у роботі потенційним PARP інгібітором Les-6485?

15. У списку використаних джерел публікації потрібно привести до одного стилю цитування.

Опонент – Бєлінська І. В., доктор біологічних наук, доцент, старший науковий співробітник кафедри клінічної медицини, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка надала позитивний відгук із зауваженнями та запитаннями:

Ви проводили дослідження токсикологічних характеристик ваших сполук, покажіть, будь ласка результати сполуки 10 на токсичність, ви порівнювали, як зазначаєте на даному

слайді із доксорубіцином який викликає лейкопенію, а досліджувана сполука лейкоцитоз, чи могли б ви пояснити такі протилежні ефекти цих сполук?

1. В главі 3.1.3, 3.1.4 Ви аналізували результати використання МТГ тесту після впливу низки досліджуваних похідних піридин-тіазолів на неопластичні клітини і отримані результати Ви описуєте, як цитотоксичний ефект, навіть пишете, що сполуки «вбивають клітини». При цьому Ви не досліджували кількість мертвих клітин за дії використаних сполук. То можливо це цитостатичний ефект і відбувається зниження їх проліферативного потенціалу, або зміна метаболічної активності? Чи досліджували Ви кількість клітин в лунках на момент внесення туди досліджуваних сполук?

2. Підпис до рисунку 6 є невдалим «Морфологічні зміни у клітинах» оскільки це мікрофотографії культури клітин KB3-1 за різних умов культивування, а морфологічні зміни за дії досліджуваних сполук Ви описуєте як дослідник.

Аналогічні зауваження стосовно рис. 7, на якому представлені мікрофотографії з флуоресцентної мікрроскопії культури клітин, що дозволяє виявляти червону і жовту флуоресценцію досліджуваних сполук. За якої довжини хвиль були оцінені клітини? Чи виявляли Ви флуоресценцію клітин за впливу цисплатину?

3. Чи можете Ви більш детально пояснити, як оцінювали індекс селективності дії досліджуваних сполук?

4. Для оцінки клоногенної активності неопластичних клітин в присутності досліджуваних сполук було використано два експериментальні підходи: клоногенний тест і клоногенний аналіз у напіврідкому агарі. Поясніть, будь ласка, чому відсутність прикріplення пухлинних клітин є важливим для оцінки протипухлинної активності?

5. Як Ви можете обґрунтувати, чому обрали саме критерій Тьюкі для оцінки відмінностей між групами, а не, наприклад, критерій Стьюдента з поправкою Бонферроні або Ньюмана-Кейсла чи Шеффе?

6. Чи могли б Ви пояснити, чому для модифікації і подальших досліджень Ви обрали сполуку Les-5303, а не інші три використані в роботі? Ви вважали її найбільш активною, але вона єдина серед інших досліджених сполук не була активною для двох ліній неопластичних клітин: лінії C6 гліоми щура і Capan-1 карциноми протоки підшлункової залози людини.

7. Поясніть, будь ласка, у чому різниця між показниками GI50 і IC50.

8. Ви одержали інгібувальний ефект нових синтезованих похідних тіазолів Les-5303, Les-6485 та інших на нормальні фібробласти миші BALB-3T3. Яке можливе практичне значення даних результатів?

9. В розділі 3.1.6 Ви оцінюєте результат впливу сполук Les-5303 та Les-6485 як індукторів мітотичної катастрофи. Які критерії оцінки даного процесу, оскільки із наведених мікрофотографій їх складно відрізнити від мітозу?

10. Поясніть, будь ласка, більш детально за якими критеріями Ви виділяли ранні апоптичні клітини, клітини на стадії пізнього апоптозу і некрозу. Результати цих досліджень описані в главі 3.1.8 і представлені на рис. 10.

11. При оцінці загальної токсичності сполуки 10 порівняно з доксорубіцином на миших Ви робите висновок про мієлосупресію за дії препарату порівняння. Проте, у крові цих мишей спостерігався підвищений відсоток нейтрофільних гранулоцитів, який не характерний для мієлосупресії. Як би Ви могли пояснити, на підставі яких даних зроблений такий висновок?

12. У другому висновку Ви стверджуєте про менший пошкоджуючий вплив на мембрани за дії сполук 10 і 19 та відсутність зменшення розміру клітин. Поясніть, будь ласка, які Ваші результати дозволяють зробити такий висновок, адже Ви не здійснювали морфометрію клітин.

Опонент – Іскра Р. Я., доктор біологічних наук, професор, професор кафедри фізіології людини і тварин, Львівський національний університет імені Івана Франка *надала позитивний відгук із зауваженнями та запитаннями:*

Скажіть, будь ласка, при досліджені сполуки Les-6486 ви використовували різні інгібітори PARPs, чим вони відрізняються? З якими сполуками маєте намір продовжувати подальші дослідження?

1. Чим Ви можете пояснити високий цитотоксичний ефект сполуки Les-5303, коли вона показала найнижчу енергію зв'язування обома молекулами PARPs(1/2).

2. Чи можна стверджувати, що сполука Les-6485 є інгібітором PARPs?

3. Як Ви можете пояснити, що інгібітор PARP1 флузапаріб знижує чутливість клітин MCF-7 до сполуки Les-6485, у той час як інший інгібітор MGMT ломегуатріб підвищує їх чутливість до цієї ж сполуки Les-6485?

4. Як Ви можете пояснити роль білка p53 у механізмах дії сполуки 10?

5. Чому, на Вашу думку, знижувався індекс маси органів до тіла у мишей, які отримували доксорубіцин?

6. Чим новосинтезовані похідні піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом відрізняються від уже існуючих затверджених протипухлинних препаратів, в основі яких є тіазолове ядро?

Сибірний А. А. - директор Інституту біології клітини, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, задав *запитання*:

«Ви сказали що сполуки взаємодіють із ДНК. Чи викликають вони якісь мутації: транзиції, трансверсії, чи це звичайна інтеркаляція без мутації?»

Луцик М. Д. - доктор біологічних наук, професор, провідний науковий співробітник відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, Інститут біології клітини НАН України, задав *запитання*:

«Що це за сполука юглон? Чим сполука юглон відрізняється від використаних у роботі?»

Стойка Р. С., доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України, професор, завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу, Інститут біології клітини НАН України, науковий керівник здобувачки. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Лесик Р. Б. - доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. *Оцінка позитивна, без зауважень.*

Результати відкритого голосування:

«За» 5 членів ради,

«Проти» - немає

«Утрималися» - немає

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада
присуджує Іvasечко Ірині Ігорівні

(прізвище, ім'я, по батькові (у разі наявності) здобувача у давальному відмінку)
ступінь доктора філософії з галузі знань 09 - Біологія
(галузь знань)

за спеціальністю 091 - Біологія

(код і найменування спеціальності відповідно до Переліку галузей знань і
спеціальностей, за якими здійснюється підготовка здобувачів вищої освіти)

Голова
спеціалізованої
вченої ради

Гончар М. В.
(прізвище, ініціали)

Рецензент

Бовк О.І.
(прізвище, ініціали)

Рецензент

Стасик О. В.
(прізвище, ініціали)

Опонент

Бєлінська І.В.
(прізвище, ініціали)

Опонент

Іскра Р.Я.
(прізвище, ініціали)

Директор ІБК НАН України
g.д.н., проф., акаадемік НАН України

Сидорчук АА.

