

## ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук, професора  
Іскри Руслани Ярославівни  
на дисертаційну роботу Івасечко Ірини Ігорівни  
«Антинеопластична дія нових похідних тiazолу і тiazолідинону та їх  
водорозчинних форм», представлену на здобуття наукового ступеня  
доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія

### **Актуальність обраної теми дисертації.**

Дисертаційна робота присвячена дослідженню механізмів антинеопластичної дії нових гетероциклічних сполук, похідних піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом. Зацікавленість гетероциклічними сполуками, похідними тіазолів зумовлена пошуком ефективних протиракових препаратів, які будуть мало токсичними для здорових клітин. У зв'язку із високою швидкістю розповсюдження онкозахворювань пошук нових фармакофорів для ефективних терапевтичних препаратів є актуальним і необхідним завданням.

Мета і завдання дисертаційних досліджень сформульовані методично грамотно, вони побудовані з урахуванням результатів, які одержані науковцями, що дозволило автору визначити для дослідження пріоритетні напрями.

Дисертаційна робота Ірини Ігорівни виконана в межах одного із основних напрямків досліджень відділу Регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України «Дослідження клітинних та молекулярних механізмів протипухлинної дії нових похідних тiazолу», підтримана грантом Національного Фонду Досліджень України № 2020.02/0035 та грантом Національної академії наук України, № 0120U103077.

### **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Основні наукові положення дисертації випливають з отриманих результатів експериментальних досліджень, вони ґрунтуються на глибокому їх аналізі. Зокрема, дисертанткою були виявлені потенційні інгібітори ферменту PARP серед нових похідних піридин-тіазолів. На основі молекулярного докінгу

запропоновано, що досліджувані сполуки взаємодіють із мішенню за відмінним від відомих раніше інгібіторів PARP механізмом та структурно не є подібними із ними. Молекули, які за механізмом дії є інгібіторами білків, задіяних у процесах репарації ДНК відіграють важливу роль у розвитку концепції синтетичної летальності як підходу до терапії раку. Встановлено, що спільне застосування сполуки Les-6485 та інгібітора MGMT викликає хімічне синтетичне підсилення. Обґрунтовано можливість застосування цієї сполуки з інгібіторами репарації або сполуками, які пошкоджують ДНК. Молекули такого типу можуть бути мішенями для моделювання низькомолекулярних інгібіторів білків, які вважаються важкими терапевтичними цілями.

Дисертанткою встановлено, що сполуки, похідні тіопірано-тіазолів, не проявляють селективної дії відносно окремих пухлинних клітинних ліній, але є менш токсичними для нормальних та псевдонормальних клітин порівняно із доксорубіцином. Лише у випадку клітин лінії HCT-116 p53-/- та дикого типу HCT-116 wt аденокарциноми товстого кишківника людини була виявлена у 2-5 разів вища чутливість клітин дикого типу порівняно із p53-дефіцитними, відмічено, що в реалізації механізму дії новосинтезованих похідних може бути задіяний білок p53 та його сигнальний шлях. Дисертанткою відмічено, що сполуки цього ряду здатні індукувати апоптоз внутрішнім та зовнішнім шляхом; ефективно взаємодіяти із ДНК електростатично та/або за типом інтеркаляції. Виявлено, що рівень взаємодії із ДНК не корелює із цитотоксичною активністю, тому сполуки можуть використовувати додаткові механізми дії для реалізації своєї активності. Також обґрунтовано перспективи подальшого використання найбільш активних похідних, що можуть брати участь у сенсibilізації ракових клітин до терапевтичних агентів.

Отримані результати експериментальних досліджень є важливими для розуміння механізмів впливу гетероциклічних сполук різної структури на пухлинні клітини ссавців та вказують на можливості їх подальшого застосування як платформи для створення ефективних сполук - кандидатів у лікарські засоби.

Основні положення дисертації науково обґрунтовані, достовірність яких

підтверджена отриманими результатами та висновками, що приведені у дисертації.

### **Аналіз змісту дисертаційної роботи**

Дисертаційна робота викладена на 159 сторінках тексту відповідно до поставленої мети і завдань. Загальна структура роботи побудована згідно вимог МОН України і містить усі необхідні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додаток 1». Робота містить 37 рисунків і 13 таблиць, які добре підтверджують експериментальні дані, доповнюють текстовий матеріал дисертаційної роботи.

На початку роботи представлена **анотація** на українській (2-5) та англійській мовах (6-9), де стисло викладені основні результати досліджень, новизна та практичне значення роботи також наводиться список публікацій дисертантки.

У **вступній частині** (21-28 ст.) дисертації авторка дає науковий аналіз та обґрунтування вибраної теми, її актуальності, наводить зв'язок роботи з державною науковою тематикою, ставить мету і завдання досліджень, розкриває наукову новизну одержаних результатів, їх практичне значення, висвітлює особистий внесок здобувача та апробацію результатів, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У **розділі 1**. «Огляд літератури» (с. 29-47) представлено інформацію про сучасний стан та перспективи хіміотерапії, висвітлено нові підходи до хіміотерапії раку, такі як терапія стовбуровими клітинами, таргентна терапія, що передбачає використання моноклональних антитіл, низькомолекулярних інгібіторів, генну терапію. У цьому розділі описані хіміотерапевтичні агенти, що взаємодіють з ДНК. Також розкрито суть терапевтичного таргетування відповіді на пошкодження ДНК при онкозахворюваннях, а також перспективи використання інгібіторів PARP.

У розділі 2 «Матеріали та методи» (с. 48-61) вказано, що у роботі дисертанткою були використані сполуки, які були синтезовані у Львівському національному медичному університеті. Як позитивні контролю були застосовані доксорубіцин, цисплатин, флузапариб, ломегуатріб і брактопін.

У дослідженнях використані культури пухлинних та псевдо-нормальних клітин. Клітинні лінії були отримані з колекції пухлинних клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, Інституту молекулярної біології та генетики Національної академії наук України та Інституту дослідження раку Віденського медичного університету (Австрія).

Були проведені дослідження протипухлинної активності сполук *in vitro* в рамках Програми розвитку терапії Національного інституту раку (США). У процесі виконання дисертаційної роботи були використані сучасні методи, такі як МТТ тест для визначення життєздатності псевдо-нормальних, нормальних і пухлинних клітин, клоногенний тест, клоногенний аналіз у напіврідкому агарі, флуоресцентна мікроскопія, метод конкурентного витіснення метилового зеленого для дослідження взаємодії сполук із ДНК, спектроскопічний аналіз для вимірювання здатності сполук взаємодіяти з ДНК, УФ-спектроскопія, метод ДНК комет для аналізу пошкодження ДНК, метод визначення рівня індукції апоптозу за допомогою анексину V, визначення зміни мембранного потенціалу мітохондрій, дослідження рівня активних каспаз 3/7, 8 та 9, вестерн-блот аналіз, метод ДНК драбинки для оцінки індукції апоптозу, інгібування PARP *in vitro*, аналіз потенційної хімічної синтетичної летальності, молекулярний докінг. Дисертанткою проводилися також дослідження токсичності сполук *in vivo* на мишах лінії C57BL/6. Отримані результати були проаналізовані за допомогою програми GraphPad Prism 6 (США).

У розділі 3. «Результати досліджень та їх обговорення» (с.62-129) висвітлені отримані результати власних досліджень, які вдало інтерпретуються автором. Дисертантка шляхом оцінки протипухлинної активності нових піридин тіазолів зробила вибір сполук для своєї подальшої роботи. У результаті було встановлено, що найбільш активна сполука ряду похідних піридин тіазолу

Les-6485 ефективно інгібує ріст клітин карциноми молочної залози людини у напіврідкому агарі та, за механізмом дії, є потенційно новим інгібітором ферменту PARP1/2, що свідчить про її значний протипухлинний потенціал. Преінкубація клітин із відомим інгібітором PARP1/2 флюзапарібом зменшує більше ніж у 3 раз чутливість клітин карциноми молочної залози до похідного Les-6485. Дана сполука чинить синергетичну дію із MGMT інгібітором та може бути перспективною хімічною пробою для дослідження її дії на здорові та пухлинні клітини як окремо, так і в поєднанні з інгібіторами ферментів репарації ДНК або з агентами, що взаємодіють ДНК.

У результаті досліджень нових похідних тіопірано[2,3-d]тіазолів з нафтохіноновим фрагментом 1-13 був виявлений їх протираковий потенціал. Синтезовані сполуки виявляли різну цитотоксичну активність, яка залежала від їх структури. Найбільш активна сполука 10 індукувала зовнішній і внутрішній шляхи апоптозу, здатна взаємодіяти з ДНК двома різними способами: через електростатичну взаємодію та інтеркаляцію. Крім цього, похідне 10 у дозі 20 мг/кг не викликало токсичної дії в організмі мишей C57BL/6. Таким чином, незважаючи на те, що традиційний протипухлинний препарат доксорубіцин і новосинтезована сполука 10 володіють схожою цитотоксичною активністю, похідне 10 демонструє *in vivo* помітно більшу біотолерантність, на відміну від доксорубіцину.

У ході виконання дисертанткою досліджень цитотоксичної дії сполук 14-19, похідних тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом, у яких відсутня ОН група у нафтохіноновому фрагменті, було виявлено, що сполука 19 демонструє значну цитотоксичну дію на лейкомічні клітинні лінії, клітини карциноми епідермоїду, товстої кишки, молочної залози. Статус p53 клітин карциноми товстої кишки впливав на протипухлинну дію досліджуваного похідного 19. Встановлено, що сполука 19 індукує проапоптотичні цитоморфологічні зміни та мітотичні катастрофи в оброблених клітинах лінії карциноми епідермоїду і у великих концентрація індукує некротичну загибель цих клітин. Проте, сполуки ряду 1-13, у яких наявний радикал ОН в

нафтохіноновому фрагменті чинять сильнішу цитотоксичну дію порівняно із сполуками 14-19.

**Розділ 4** «Аналіз та узагальнення результатів» (с.130-133) містить аналіз одержаних результатів власних досліджень з обговоренням виявлених змін основних показників. Оцінюючи матеріали цього розділу необхідно відзначити наукову глибину проведеного дисертанткою аналізу отриманих даних. На основі обговорених результатів дисертантка робить висновок, що досліджені у роботі похідні тіазолів володіють протипухлинним потенціалом та можуть бути використані як моделі для синтезу перспективних антинеопластичних сполук. Крім цього, викладені у дисертації дослідження підкреслюють можливість їх використання у різних стратегіях терапії раку, таких як індукція синтетичної летальності та сенсibiliзація пухлинних клітин, стійких до існуючих препаратів.

Проведений аналіз результатів власних досліджень та їх узагальнення у цьому розділі дало можливість дисертантці зробити науково обґрунтовані висновки, які впливають з представленого в дисертації фактичного матеріалу.

**Сім висновками** (с.134-135), що приведені у дисертації достатньо повно висвітлюють одержані результати та основні положення дисертації. Висновки відповідають завданням дисертаційного дослідження та мають наукову цінність.

**Список використаних джерел** (с.136-154) налічує 141 джерело на англійській мові. Майже 60 % з яких – це література за останні 5 років.

Додаток 1 (с.155-159) – це список публікацій автора за темою дисертації.

**Повнота викладання основних наукових положень та висновків в опублікованих наукових працях.**

Детальний аналіз дисертаційних матеріалів, проведений у період їх рецензування, свідчить, що результати наукової роботи Івасечко Ірини Ігорівни є підсумком завершених досліджень, які впродовж періоду їх виконання всебічно аналізувалися і висвітлені у 12 працях, з яких 4 статті у виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus (одне видання Q1, два видання Q2 та одна праця у виданні Q4), 8 тез

доповідей у матеріалах конференцій, з'їздів та конгресів. Основні положення дисертації науково аргументовані та в повній мірі відображені в наукових статтях.

У період аналізу дисертаційної роботи суттєвих зауважень до неї не виявлено, були лише незначні технічні помилки на ст. 19, 20, 54, 124, 125 та ін., однак виникли деякі запитання, зокрема:

- Чим Ви можете пояснити високий цитотоксичний ефект сполуки Les-5303, коли вона показала найнижчу енергію зв'язування обома молекулами PARPs(1/2).
- Чи можна стверджувати, що сполука Les-6485 є інгібітором PARPs?
- 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?
- Як Ви можете пояснити роль білка p53 у механізмах дії сполуки 10?
- Чому, на Вашу думку, знижувався індекс маси органів до тіла у мишей, які отримували доксорубіцин?
- Чим новосинтезовані похідні піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів з нафтохіноновим фрагментом відрізняються від уже існуючих затверджених протипухлинних препаратів, в основі яких є тіазолове ядро?

### **Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи Івасечко Ірини Ігорівни «Антинеопластична дія нових похідних тіазолу і тіазолідинону та їх водорозчинних форм» є самостійним, завершеним науковим дослідженням. Актуальність обраної теми дослідження, достовірність та наукова новизна одержаних результатів, обґрунтованість наукових положень та висновків, їх вірогідність та повнота викладу в опублікованих працях свідчать про глибоку наукову самостійність авторки, сучасний рівень проведеного дослідження. За структурою та змістом, актуальністю, новизною, практичним значенням вищезазначена дисертація повністю відповідає вимогам наказу МОН

України №40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації», а також 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 №44, а її автор, Івасечко Ірина Ігорівна, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

**Офіційний опонент:**

Професор кафедри фізіології людини і тварин

Львівського національного університету імені Івана Франка,

доктор біологічних наук, професор

Руслана ІСКРА