

ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук,
Белінської Ірини Василівни
на дисертаційну роботу Івасечко Ірини Ігорівни
«Антинеопластична дія нових похідних тіазолу і тіазолідинону та їх водорозчинних форм», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми дисертації.

На сьогодні існує близько 20% ризику захворіти на рак протягом життя (до 75 років) і 10% ризику смерті від раку; кожна п'ята людина протягом життя захворіє на рак, а кожна десята помре від цієї хвороби. Прямі медичні витрати на лікування раку в Сполучених Штатах оцінювалися в 183 мільярди доларів у 2015 році і прогнозується, що ці витрати зростуть у 1,3 рази до 246 мільярдів доларів до 2030 року [Siegel RL, et al. 2022.]

Станом на початок 2021 року в Україні на обліку в медичних установах перебувають 1 млн 187,6 тисяч пацієнтів з онкологічними захворюваннями. В 2019-му від онкологічних захворювань померла 61 тисяча 289 осіб. У 2019 році на діагностику і лікування за програмою медичних гарантій було виділено 2,42 млрд грн, в 2020-му – 3,2 млрд (+31,8%). [Федоренко З.П., Михайлович Ю.Й. та ін. РАК В УКРАЇНІ, 2019-2020 БЮЛЕТЕНЬ НАЦІОНАЛЬНОГО КАНЦЕР-РЕЄСТРУ УКРАЇНИ № 22].

Отже актуальність у пошуках ефективного лікування таких захворювань, яке має окрім соціального й економічне значення, не викликає сумніву.

Наукова новизна

Високий відсоток смертності серед онкопацієнтів пов'язаний із нечутливістю неопластичного клону до існуючих протоколів лікування та/чи розвитком метастазів. Такі невтішні результати спонукають дослідників до поглиблення знань біологічної поведінки таких неоплазій і постійного пошуку нових сполук з протипухлинною активністю. Все вищеперераховане доводить актуальність обраного Івасечко Іриною Ігорівною напрямку досліджень.

Практичне значення

Очікується, що між 2018 і 2040 роками рак стане причиною близько восьми мільйонів передчасних смертей. Сукупні прогнозовані витрати на продуктивність у цьому відношенні становлять 1,3 трильйона євро, що становить у середньому 58,7 мільярда євро на рік, або 0,43% валового внутрішнього продукту ЄС-27.

Виходячи з цього розробка, синтез хімічних сполук з експериментально доведеною протипухлинною активністю українського походження дозволить розробити нові медичні препарати, які спрямовані на подолання резистентності до існуючої терапії, і забезпечить українських пацієнтів доступними сучасними ліками.

Оцінка змісту дисертації

Повнота викладання основних наукових положень та висновків в опублікованих наукових працях. Представлені в дисертаційної роботи результати опубліковані у 12 наукових роботах, 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 тезах доповідей у матеріалах конференцій, з'їздів та конгресів.

Структура та обсяг дисертації

Структура дисертації відповідає загально прийнятому формату, складається із розділів: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додаток 1». Дисертацію викладено на 159 сторінках. Робота містить 37 рисунків, 13 таблиць та 141 джерело літератури.

Аналіз змісту дисертаційної роботи

В «Огляді літератури» описані існуючі хіміотерапевтичні підходи в лікуванні онкологічних захворювань і висвітлені проблеми нечутливості та розвитку резистентності до протипухлинних препаратів. Представлені результати останніх десятиріч із секвенування геному нормальних і

трансформованих клітин для пошуку ключових механізмів впливу на пухлинний ріст із мінімальним пошкоджуючим впливом на неушкоджені клітини і тканини. Подані сучасні підходи розвитку імунотерапії раку. Також наведені успішні результати створення таргетних препаратів за результатами молекулярних досліджень поведінки лейкемічних і пухлинних клітин. Описані різні підходи у розробці протипухлинних препаратів на різні структурні і метаболічні шляхи клітин шляхом модифікації структури ДНК, інгібування процесів репарації і індукції апоптозу, інгібування ензимів реплікації ДНК та метаболічних процесів в клітині.

У розділі «Матеріали і методи» детально описані матеріали і реактиви, які використані для проведення досліджень, клітинні лінії та їх біологічне походження, лінії миші, послідовність і процедуру виконання досліджень, обладнання для проведення вимірювань і принципи оцінки одержаних експериментальних даних, а саме статистичні підходи в оцінці відмінностей між групами. Необхідно підкреслити, що дослідження на тваринах проведені відповідно до вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин і були затверджені Біоетичною комісією Інституту біології клітини НАН України (Протокол № 5/2021 від 08.04.2021). У разі проведення досліджень на клітинах здорових донорів і хворих з гематологічними захворюваннями, була одержана їх поінформована згода участі в дослідженнях, протоколи проведення досліджень затверджені Етичним комітетом Інституту біології клітини НАН України (протоколи № 2 від 27 січня 2019 р. та № 2 від 7 жовтня 2020 року). Але, при аналізі цього розділу дисертації, виникли деякі запитання, які винесені у розділ відгуку «Дискусійні зауваження та запитання».

У розділі «**Результати досліджень та їх обговорення**», представлені результати власних досліджень впливу низки похідних *піридин-тіазолів* та *тіопірано-тіазолів* з *нафтохіноновим фрагментом* на проліферативну активність пухлинних клітин різного походження, для оцінки їх цитотоксичної та/або цитостатичної активності. Зазначені похідні синтезовані в Україні науковою групою Львівського національного медичного університету під

керівництвом професора Романа Богдановича Лесика, що є важливою складовою для подальшого створення лікувальних препаратів українського походження.

Івасечко Іриною Ігорівною у складі наукової групи під керівництвом члена-кореспондента НАН України Ростислава Стефановича Стойки було встановлено, що серед досліджених на початкових етапах чотирьох похідних піридин-тіазолів на шість ліній неопластичних клітин різного походження (гліобластоми, лейкемії, карциноми протоки підшлункової залози, карциноми товстої кишки, карциноми шийки матки) всі пригнічували їх ріст на 50% у фізіологічних концентраціях менше 100 мкМоль, але сполуку Les-5303, як найбільш активну, обрали для модифікації і подальших досліджень. Модифікації вихідної молекули були спрямовані на покращення розчинності, виявлення активності ненасиченого кетона вихідної молекули Les-5303 і спрямування активності як «проакцепторів Міхаеля» для впливу сполуки на різні біологічні процеси і, за рахунок цього, залучення декількох механізмів реагування неопластичних клітин, тобто як багатоцільові молекули.

За результатами експериментальних досліджень Ірині Ігорівні вдалося виокремити серед чотирьох похідних вихідної сполук Les-5303 найактивніше похідне Les-6485, яке створювалось як «проакцептор Міхаеля». Авторкою визначена важлива роль ненасиченого кетону в структурі піридин-тіазолів для пригнічення росту пухлинних клітин, а введення піразолінового фрагмента зменшує їх активність, що має практичне значення для подальших розробок нових похідних з протипухлинною активністю.

Хотілось би підкреслити різнобічний підхід Ірини Івасечко у постановці дослідів і проведення досліджень із використанням декількох методичних підходів, для встановлення протипухлинної активності. Після аналізу дисертантом скринінгових результатів протипухлинної активності похідних сполуки Les-5303 (Les-6485, Les-6486 та Les-6451) за результатами тесту з сульфорадаміном В, виокремлена найбільш активна сполука Les-6485 щодо інгібування росту із використанням 60 ліній пухлинних клітин. Надалі проведений поглиблений аналіз чотирьох похідних з застосуванням МТТ-тесту для оцінки життєздатності панелі неопластичних клітин за їх впливу, а також

оцінена їх здатність впливати на іморталізовані кератиноцити, фібробласти і лейкоцити здорових донорів для оцінки токсичного впливу щодо нормальних клітин організму. Одержані результати дозволили довести нижчу чутливість здорових клітин до досліджуваних сполук (інгібуюча концентрація перевищувала 50 мікроМоль) на відміну від неопластичних клітин, для яких 50% інгібування їх росту відбувалось у концентраціях в середньому від 2,79 до 7,79 для найбільш активного досліджуваного похідного, що прогнозує низьку токсичність сполук до здорових (не уражених неопластичним процесом) тканин. Низьку загальну і гематологічну токсичність сполуки Les-6485 в подальшому доведено в дослідях *in vivo* на мишах лінії C57BL/6. Хотілось би додати, що результати дослідження протипухлинної активності сполук *in vitro* і *in vivo*, а саме оцінку їх ефективності, порівнювали з ефективністю сучасних протипухлинних препаратів, а саме доксорубіцину і цисплатину, що є необхідним для доведення ефективності токсичних ефектів нових сполук.

Іншим питанням, над вирішенням якого працювала дисертантка, було дослідження механізмів дії обраних похідних Les-5303 і Les-6485, які мали найбільшу активність за результатами попередніх досліджень. Декількома методичними підходами оцінена здатність цих сполук індукувати апоптичну загибель клітин. Для вирішення поставленої задачі використаний комплексний підхід із застосуванням декількох морфологічних і молекулярно-біологічних методів оцінки стану клітин, таких як вивчення здатності сполук взаємодіяти з молекулою ДНК, здатності індукувати пошкодження ДНК, поява фосфатидил серину на поверхні клітин методом проточної цитометрії, як раннього маркера апоптозу, зміна потенціалу мітохондріальної мембрани, активація ініціаторних і ефекторних каспаз, мікроскопічні зміни клітин. Необхідно відзначити високої якості мікропрепарати і їх мікрофотографії клітин KB3-1 за впливу досліджуваних сполук і сполук порівняння, що дозволяє разом із біохімічними методами дослідження довести активацію апоптозу. Локалізація флуоресцентних продуктів всередині клітини доводить здатність сполук долати мембранний бар'єр і потрапляти в цитоплазму клітини для реалізації свої

ефектів. Це відкриває шляхи моніторингу локалізації речовин у різних об'єктах для подальших досліджень.

Вдале застосування моделювання *in silico* дозволило визначити молекулярну мішень сполуки Les-6485, а саме ензиму полі-АДФ-рибозополімерази (PARP), залученого до процесів репарації ДНК. Проведено низку дослідів з використанням інгібіторів PARP, що дозволили експериментально довести залучення інгібування активності PARP до реалізації ефектів Les-6485. Практичне значення цих результатів у поєднанні з іншими інгібіторами процесів репарації ДНК дозволить розробити шляхи пригнічення проліферативної активності ракових клітин грудної залози, до прикладу з дефіцитом поліфункціонального регуляторного білка гена *BRCA1* для подолання стійкості до протипухлинної терапії.

Іншою групою сполук, досліджених в ході виконання дисертаційної роботи, були похідні тіазолідинонів з нафтохіноновим фрагментом. Аналогічні підходи з пошуку найбільш активних сполук дозволили виявити сполуку за номером 10, що проявляла більш широкий спектр протипухлинної активності, порівняно з іншими похідними. Окрім цього, одна із ліній меланоми MALME-3М, продемонструвала найбільшу чутливість, що в подальших дослідженнях такого феномену може сприяти успішному подоланню цієї патології. Доведено індукцію апоптозу за дії сполуки 10, як через зовнішній механізм шляхом активації каспази 8, так і через внутрішній механізм, який підтверджується зниженням мембранного потенціалу мітохондрій і активацією каспази 9. Також встановлено p53-опосередкований механізм реалізації проапоптичного ефекту досліджуваних сполук.

Дисертація завершується висновками, які відповідають завданням дисертаційного дослідження, чітко сформульовані на основі одержаних власних експериментальних результатів та свідчать про протипухлинну активність похідних піридин-тіазолів та тіопірано-тіазолів із нафтохіноновим фрагментом, шляхом інгібування проліферативної активності та індукції апоптозу неопластичних клітин.

Список використаної наукової літератури налічує 141 джерело англomовних видань, 65% яких за останні п'ять років.

Дискусійні зауваження та запитання:

1. В главі 3.1.3, 3.1.4 Ви аналізували результати використання МТТ тесту після впливу низки досліджуваних похідних піридин-тіазолів на неопластичні клітин 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 змін 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 мікроскопії 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?

Під час аналізу матеріалів дисертаційної роботи виникли деякі запитання до розділу «Матеріали і методи досліджень»

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

2. 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 прикріплення пухлинних клітин є важливим для оцінки протипухлинної активності?

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

Запитання до розділу «Результати досліджень та їх обговорення»

1. 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 С6 гліоми щура і Саран-1 карциноми протоки підшлункової залози людини.
2. Поясніть, будь ласка, у чому різниця між показниками GI50 і IC50.
3. 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?
4. 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?
5. 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.
6. При оцінці загальної токсичності сполуки 10 порівняно з доксорубіцином на мишах 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?
7. 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.

Наведені вище дискусійні питання і запитання, які виникали при аналізі дисертаційної роботи, *не знижують наукової цінності роботи*. В цілому, хочу підкреслити, що дисертаційна робота виконана на високому науково-методичному рівні, вона дуже ґрунтовна і якісно проаналізована.

Загальний висновок

Підсумовуючи вищевикладене можна зробити висновок, що дисертаційна робота Івасечко Ірини Ігорівни «Антинеопластична дія нових похідних тіазолу і тіазолідинону та їх водорозчинних форм» є самостійним, завершеним науковим дослідженням. За структурою та змістом, актуальністю, новизною, практичним значенням, ступенем достовірності та обґрунтованості результатів та повнотою їхнього викладення у наукових публікаціях, 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 авторка, Івасечко Ірина Ігорівна, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент

Доцент кафедри клінічної медицини,
Навчально-наукового центру
«Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор біологічних наук

Ирина

Ірина БЄЛІНСЬКА

Дата



[Handwritten signature]