

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Шалай Ярини Романівни на
тему «**РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У
АНТИНЕОПЛАСТИЧНІЙ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ ТІАЗОЛУ**»
представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі
спеціальності 03.00.02 – біофізика

Біологія

1. **Актуальність теми дисертації.** В останні десятиліття велика увага приділяється розробці нових препаратів для лікування новоутворень. Величезна кількість різних природних та синтетичних сполук були випробувані під час медико-біологічного скринінгу. Однак, у медичну практику впроваджено лише кілька десятків препаратів. Отже, проблема створення ефективних малотоксичних протиракових засобів залишається невирішеною до кінця, незважаючи на те, що було виявлено багато потужних мішеневих препаратів, що пригнічують канцерогенез, зокрема, в експерименті. В групі потенційних засобів протипухлинної дії розглядаються похідні тіазолу. Особливий інтерес становлять похідні 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та похідні піразолопіримідину, як потенційні протипухлинні препарати. Зокрема, наявні у структурі гетероцикли (тіазольні та бензофуранові) можуть визначати цитотоксичні властивості речовин та їх специфічність, зокрема, впливу на систему антиоксидантного захисту, перекисне окиснення ліпідів, а також здатність інтерколяції в ДНК, що може викликати апоптичну загибель злоякісно трансформованих клітин. Таким чином, актуальність представленої роботи не викликає сумніву.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біофізики та біоінформатики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках науково-дослідних тем «Енергетичні процеси у мітохондріях ракових клітин та гепатоцитів за дії азолів та похідних фурану

з протипухлинною активністю (2016-2018 рр., № держреєстрації 0116U001533), «Механізми подолання резистентності та підвищення ефективності протипухлинної дії похідних тіазолу в комплексі з нанорозмірними полімерними носіями» (2019-2021 рр.)

2. **Наукова новизна роботи** полягає у визначенні цитотоксичної дії *in vitro* похідних 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу (БФ1) та піразолопіридину (ПП2) на пухлинні клітини меланоми, гліобластоми та мієлоїдної лейкемії. Уперше визначено процеси перекисного окиснення ліпідів та стан антиоксидантної системи за дії досліджуваних похідних тіазолу як потенційний механізм апоптичної/некротичної загибелі пухлинних клітин. Проведено порівняльний аналіз цитотоксичної дії цих речовин щодо пухлинних клітин та здорових клітин, зокрема, ембріональних клітин нирки людини та кератиноцитів і гепатоцитів миші. Відносно здорових клітин токсичність похідних 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину була мінімальною. На підставі отриманих результатів запропонована схема біофізичних та біохімічних механізмів реалізації цитотоксичності похідних тіазолу в пухлинних клітинах.

3. **Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.**

В дисертаційній роботі наведено теоретичне обґрунтування перспективності досліджених похідних 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину як протипухлинних засобів. Для цих речовин доведено антиоксидантну дію як один із можливих механізмів цитотоксичності щодо трансформованих клітин. Поряд з тим наводяться дані майже відсутніх токсичних ефектів відносно ембріональних клітин та гепатоцитів. Експериментальні дані та теоретичні узагальнення дисертаційної роботи плануються бути впровадженими у навчальний процес на кафедрах біофізики та біоінформатики і фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у загальному курсі «Біофізика» та спецкурсів «Неоплазія», «Біоенергетика» і дисциплін вільного вибору студентів. Методичні і експериментальні

розробки будуть використані студентами та аспірантами під час виконання курсових, дипломних та дисертаційних робіт.

4. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертанткою проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних біофізичних фізіологічних, біохімічних методів. Отримані результати проаналізовано за допомогою сучасних статистичних методів обробки даних. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам для підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних, зроблені висновки відображають поставлені завдання дисертаційної роботи

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації. Дисертація складається із 4 розділів - «Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження», «Результати досліджень та їхнє обговорення» та «Узагальнення», а також «Вступу», «Списку власних публікацій», цитованих джерел літератури, висновків. Робота викладена на 151 сторінці, містить 40 рисунків та 2 таблиці. Бібліографічний список літератури налічує 192 джерела, переважна більшість яких датується в останні 5 років. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях у фахових наукових виданнях, із яких 2 - в наукометричній базі Scopus та 13 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

Розділ 1. «Огляд літератури» містить 6 підрозділів, в яких автором проаналізовано механізми дії метаболітів кисню, якими є досліджувані похідні 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину. Автором зазначається, що інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення за дії активних форм кисню призводить до посилення пероксидного окиснення ліпідів, окисної модифікації білків, деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричиняє структурні та метаболічні порушення у

клітинах. Підвищення концентрації АФО внаслідок зміщення рівноваги між процесами їхнього утворення та детоксикації є передумовою порушення функціональної активності клітин та розвитку патологічних процесів, в тому числі виникнення новоутворень.

Огляд свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в обраній галузі досліджень, критичне відношення до опублікованих результатів, здатність виокремлювати та узагальнювати головне з досить чималого масиву розрізнених літературних відомостей, чітко викласти стан та перспективи досліджень.

До даного розділу є декілька зауважень:

Не зважаючи, на досить лаконічне викладення матеріалу у розділі «Огляд літератури», окремі підрозділи виглядають відокремленими один від одного. Також у деяких з них не вдало наведено ілюстративні матеріали, зокрема підрозділ 1.2. Антиоксиданти та інгібітори вільнорадикальних процесів закінчується таблицею, після якої слід було б навести опис даних, представлених в ній, перед переходом до іншого підрозділу. Також, в кінці розділу огляд літератури доцільно було б навести узагальнююче резюме, яке б логічно підводило до мети та завдань проведення власних досліджень по визначенню активності новосинтезованих сполук похідних тіазолу як потенційних протипухлинних засобів.

Розділ 2. «Матеріали та методи досліджень» складається з 13 підрозділів сучасних методів досліджень, які включають комплекс біофізичних, молекулярно-біологічних, біохімічних, морфологічних досліджень, методів культури клітин та експериментальної онкології. Методи, які застосовані в даному експериментальному дослідженні є високотехнологічні та адекватні поставленим меті та завданням.

В розділі описані експериментальні пухлинні моделі *in vivo* *in vitro*, а також клітини гепатитарного та ембріонального походження щодо яких проводили тестування новосинтезованих тіазолових сполук.

Детально описані біофізичні методи такі як трансмісійна електронна мікроскопія для дослідження тканин після впливу похідних 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину, полярографічні дослідження дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях, виділених із клітин лімфоми та печінки; флуоресцентна мікроскопія, методи дослідження вмісту первинних та вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів з визначення ТВК-активних продуктів, які вказують на степінь перекисного окиснення ліпідів за дії досліджуваних сполук в гомогенатах лімфоми та печінки а також методи дослідження активності ферментів антиоксидантної системи.

Проте, до деяких методів експериментального дослідження є запитання.

Зокрема, при визначенні цитотоксичності було застосовано МТТ-колориметричний метод дослідження, біохімічна суть якого ґрунтується на тому, що мітохондріальні дегідрогенази живих клітин здатні розщеплювати кільця тетразолу з утворенням нерозчинних у воді фіолетових кристалів. Відновлювальна активність дегідрогеназ в значній мірі залежить від концентрації внутрішньоклітинного NADH та NADPH, вміст яких пов'язаний з наявністю позаклітинної глюкози. У відновленні МТТ в основному беруть участь мітохондріальна сукцинатдегідрогеназа та цитохром С. Таким чином, сполуки, які впливають на інтенсивність відновлення МТТ можуть виступати у якості модифікаторів мітохондріального дихання. Тож для підтвердження цитотоксичної дії було б непогано вирахувати співвідношення живих та мертвих клітин після зафарбовування трипановим синім.

Загалом, стосовно розділу матеріали та методи досліджень слід зазначити велику кількість застосованих методів та концепцій дослідження, технічних підходів щодо проведення протипухлинного скринінгу новосинтезованих сполук

Розділ 3 «Результати власних досліджень» складаються з 10 підрозділів.

Підрозділ 3.1 присвячено аналізу цитотоксичності похідних тіазолу стосовно різних культур пухлинних клітин з використанням МТТ-тесту. З приводу цитотоксичності, при аналізі матеріалів та методів уже вказувалось на доцільність підрахунку живих та мертвих клітин, хоча б в концентраціях рівних показнику IC50. В порівнянні з доксорубіцином показник IC50 на клітинах меланоми був рівновеликим досліджуваним сполукам, тоді як клітини гліобластоми були чутливішими до 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу, ніж до доксорубіцину. У підрозділі 3.2 проведено морфологічний аналіз клітин з використанням електронної мікроскопії. Виявлено, що досліджувані речовини БФ1 і ПП2 зумовлюють деструктивні зміни структури клітин лімфоми такі як фрагментація і дезінтеграція ядра, руйнування плазматичної мембрани, набухання крист мітохондрій, збільшення кількості лізосом, апоптоз, некроз, фагоцитоз. В порівняльному аналізі дії новосинтезованих сполук до ембріональних клітин та кератиноцитів виявлено значно вищі показники IC50 ніж до пухлинних клітин. Поряд з тим похідні 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину були менш токсичними до цих клітин, ніж доксорубіцин.

Цікаві результати представлено в підрозділі 3.4 де йде мова про роль похідних тіазолу як модуляторів цитотоксичності «перехоплювачами» активних форм Оксигену. Автором стверджується, що перехоплювачі АФО знижують цитотоксичну дію похідних тіазолу, частки їх впливу становлять 50-70%. Однак виникає запитання щодо проапоптичної дії цих сполук, які виступають перехоплювачами оксигену?

Наступний підрозділ досліджень, представлений автором зосереджено на оцінці рівня інтенсивності перекисного окислення ліпідів як одного із важливих етапів у вивченні про- та антиоксидантних процесів у пухлинних клітинах. Виявлено, що похідне 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу спричиняє

зростання рівня гідропероксидів ліпідів та зниження рівня супероксидного радикалу у клітинах лімфоми, тоді як за дії піразолопіридину вміст гідропероксидів та рівень супероксидного радикалу не змінюється, але знижується вміст ТБК-позитивних продуктів у клітинах лімфоми. Похідне 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу зумовлює накопичення пероксиду Гідрогену та не впливає на рівень супероксидного радикалу у клітинах гліобластоми.

При вивченні активності ферментів антиоксидантного захисту було виявлено, що досліджені сполуки спричиняють підвищення активності супероксиддисмутази та зниження активності каталази і та глутатіонпероксидази у клітинах лімфоми. Такі зміни можуть бути частиною механізму цитотоксичної дії досліджуваних речовин.

До даного підрозділу є запитання, а можливо побажання на майбутнє. На сьогодні, при дослідженні новостворених сполук хімічного походження як потенційних лікарських засобах часто розглядається питання їх нечутливості до пухлинних клітин. У виникненні медикаментозної резистентності пухлин в якості маркерного ферменту виділяють гама-глутамілтранспептидазу, яка відіграє провідну роль у метаболізмі антиоксиданту глутатіону. Тож, чи визначали Ви активність ГГТ за дії похідних 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину в пухлинних клітинах.

В механізмах прогресії пухлинного клону ключову роль відіграє метаболічне перепрограмування, яке пов'язане з переходом на безкисневий гліколіз та порушення окисного фосфорилування і дисфункції мітохондрій. Для визначення ефективності досліджуваних сполук визначали параметри функціонування мітохондрій в пухлинних клітинах та в гепатоцитах. Не було зафіксовано змін в параметрах дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях клітин печінки. Що стосується пухлинних клітин то виявлено ультраструктурні зміни мітохондрій під впливом досліджуваних цитотоксичних речовин, зміни рівня про- та антиапоптичних білків і зміна мембранного потенціалу мітохондрій.

Дисертація завершується аналізом та узагальненням результатів та висновками, які є аргументованими та відповідають поставленим меті та завданням. Отримані результати та можливі механізми дії похідних тіазолу на пухлинні клітини узагальнені автором в кінці даного розділу схемою, яка логічно підсумовує отримані результати. Також автором наголошується, що досліджувані похідні тіазолу проявляють виражену цитотоксичну дію щодо низки ліній пухлинних клітин, співрозмірну або й вищу порівняно з класичним хіміопрепаратом доксорубіцином. Важливим аргументом наведеним автором є те, що досліджувані похідні тіазолу, виявляють високу селективну цитотоксичність стосовно пухлинних клітин і не впливають на неракові клітини, і, відповідно, можуть бути використані в доклінічних дослідженнях як потенційні протипухлинні засоби, які не володіють побічними ефектами.

Таким чином, дисертація Шалай Ярини Романівни «Роль вільнорадикальних процесів у антинеопластичній активності похідних тіазолу» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних форумах та з'їздах. За темою дисертації Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 6 статтях у фахових наукових виданнях, дві із яких належать до наукометричної бази Scopus та 13 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної проблеми, на які спирається автор. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

За позитивної оцінки, проведеної автором роботи можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації:

1. Стосовно сучасних термінів вірним є «рак легені» (а не легенів) «рак грудної залози» (а не молочної) .
2. Бажано у практичному значенні роботи озвучити не наміри будуть впроваджені у навчальний процес, а вже результат практичного застосування
3. На Вашу думку, яка із основних структур у будові похідного 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину може впливати/чи не впливати на мембранний потенціал мітохондрій пухлинних клітин.
4. Як Ви можете пояснити той факт, що за дії досліджуваних похідних тіазолу параметри дихання та окисного фосфорилування статистично не змінювались? І що Вам відомо про інші похідні тіазолу з приводу даних параметрів?
5. Які із досліджених ферментів антиоксидантної системи мали найбільшу спорідненість до похідних 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину?
6. В якості референтного препарату порівняння обрано доксорубіцин. Поясніть, будь ласка, чому? І які переваги та побічні ефекти на Вашу думку мають досліджені похідні 2-аміно-5-бензил-1,3-тіазолу та піразолопіридину як відносно пухлинних клітин так і ембріональних та гепатоцитів?
7. Також зустрічаються по тексту громіздкі, стилістично невдалі речення, орфографічні помилки.

Частина зауважень та запитань прокоментовано у вищенаведеному тексті при рецензуванні різних розділів даної роботи.

Не зважаючи на запитання та зауваження, слід підкреслити, що зазначені недоліки та поставлені запитання не знижують загальної позитивної оцінки та визнання високого науково-теоретичного та практичного значення запропонованих науково обґрунтованих і впроваджених в навчальний процес результатів дисертації.

8. **Відповідність дисертації встановленим вимогам.** Дисертаційна робота Шалай Ярини Романівни на тему «Роль вільнорадикальних процесів у антинеопластичній активності похідних тіазолу» представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук є закінченим науковим дослідженням. Робота відповідає вимогам пп.11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а пошукач заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.02 – біофізика Біологія

Професор кафедри біомедицини
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
д. б.н., проф

Л.В.Гарманчук

Підпис засідача
Вчений секретар ННЦ
КАРАУЛЬНА Н
16.02

