

ВІДГУК

офіційного опонента Циганкової Вікторії Анатоліївни
на дисертаційну роботу Козир Анни Михайлівни «Біологічна активність
S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола», представлену на здобуття наукового
ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»
(галузь знань 09 «Біологія»).

Актуальність теми дисертації. Дисертаційна робота Козир Анни Михайлівни присвячена пошуку нових селективних біорегуляторів серед S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола і вивченню їхньої біологічної активності.

Похідні хіноліну є важливими азотовмісними низькомолекулярними гетероциклічними сполуками, які використовуються як структурні фрагменти для отримання фармакологічно активних сполук. Завдяки масиву доступної та висвітленої інформації про медичний потенціал хіноліну та його функціоналізованих похідних, для медиків може бути відкрита нова можливість отримати доступ до більшої кількості біомолекулярних хінолінів для майбутньої розробки ліків. Так, похідні 7-хлорохінолін-4-тіола та його S-заміщені мають достатньо широкий спектр фармакологічної активності й відомі як біологічно активні речовини з антималярійною, бактерицидною, антиоксидантною та іншими видами біологічної дії. У цьому ряду відомі сполуки з протипухлинними та імуномодуючими властивостями, вони також перспективні для лікування вірусних інфекцій. Приймаючи до уваги різноманітність біологічних властивостей природних похідних хіноліну, перспективним напрямком є пошук їх синтетичних аналогів, а також створення нових структур з хіноліновим циклом, що володіють більш потужним та широким спектром фармакологічної активності.

Вельми перспективним напрямком є також пошук нових біологічно активних сполук, які належать до хіноліну та його функціоналізованих похідних для використання в рослинництві як стимуляторів росту рослин та гербіцидів. Важливо відмітити, що інтенсивність наукових досліджень в цьому

напрямку зростає в усьому світі. Відтак актуальність та наукове обґрунтування теми дисертації не викликає жодних сумнівів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у межах тематичних планів Запорізького національного університету - «Раціональний дизайн S, N-модифікованих амінотіолів як потенційних протирадіаційних засобів» (№ 0119U000226, керівник к.б.н., доцент Корнет М.М), а також проектів наукових робіт та науково-технічних (експериментальних) розробок молодих учених (МОН України, 2018). Термін реалізації 01.01.2019-31.12.2021 р.

Достовірність та наукова новизна одержаних результатів. Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Достовірність наукових положень дисертаційної роботи не викликає сумнівів, оскільки вони ґрунтуються на аналізі літературних джерел щодо біологічних властивостей S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола та підтверджуються даними експериментальних досліджень.

Розглядаючи основні положення наукової новизни представленої дисертації, необхідно відзначити, що дисертанткою вперше було розроблено комбінаторну бібліотеку та проведено комплексну оцінку біологічного потенціалу 7-хлорохінолін-4-тіола та його похідних. Проведено віртуальний скринінг біологічної активності S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола з використанням комп'ютерних програм - PASS, TEST, GUSAR, QSAR, а також експериментально досліджено протиракову, антибактеріальну, фітотоксичну, рістстимулюючу, антирадикальну, гіпоглікемічну, фагоцитарну активності цих сполук. Визначено токсичність похідних ((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)карбонових кислот *in silico* та гостру токсичність *in vivo*; встановлено, що досліджувані сполуки у своїй більшості належать до малотоксичних речовин.

Виділено найбільш активні сполуки (hit-compounds) – сполуки 2-((хінолін-4-іл)тіо)ацетатна та 2-((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)ацетатна кислоти з вираженою рістстимулюючою рослин активністю, та інші сполуки з високою біологічною активністю: сполука ((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)сукцинатна кислота

з вираженою цитопротекторною дією щодо захисту сперматозоїдів; сполуки 2-((7-хлорхінолін-4-іл)тіо)пропіонова кислота та натрієва сіль 2-аміно-3-((7-хлорхінолін-4-іл)тіо)пропіонової кислоти з вираженою антиоксидантною активністю, а також сполуки натрій 3-((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)пропіонат та 3-((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)пропіонова кислота з високим рівнем гіпоглікемічної активності.

Результати, отримані автором дисертаційної роботи, полягають у розробці методів одержання широкого ряду нових S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола та модифікації їх структури. Дослідженні сполуки є базовими для синтезу нових потенційно біологічно активних сполук.

Отримані результати біологічних досліджень дозволили рекомендувати сполуки в освітній процес кафедри природничих наук і методик їх викладання факультету математики, природничих наук та технологій Центральноукраїнського державного університету імені Володимира Винниченка, в науково-дослідну роботу Інституту сільського господарства Степу НААН України м. Кропивницький та науково-дослідну роботу лабораторії діагностичного центру ТОВ «ДЦ «МЕДЛАЙФ-БІО» м. Запоріжжя.

Загальні дані про структуру дисертації та аналіз її змісту. Структура дисертаційної роботи включає такі розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи дослідження», «Результати та обговорення», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додатки». Дисертація викладена на 125 сторінках машинопису. Робота містить 13 таблиць, 37 рисунків та 4 формули.

Вступ за змістом і об'ємом відповідає існуючим вимогам.

Перший розділ роботи представляє літературний огляд, що висвітлює різноманітність біологічної активності похідних хіноліну. Він добре структурований та охоплює більш як 80 літературних джерел за темою дисертаційної роботи. Дослідження останніх років показали, що додавання різних фармакофорних груп та замісників призводить до появи нових ефектів і посилення біологічної активності похідних хіноліну, які в перспективі можуть

бути використані фармакотерапевтичні засоби або регулятори росту та розвитку рослин.

Літературний огляд підтверджує актуальність обраної теми дослідження і перспективність подальшого моделювання та дослідження гібридів, що поєднують у своїй структурі азотовмісний гетероцикл (хінолін) та меркаптовмісну групу.

Другий розділ присвячено опису методології дослідження. Розділ містить перелік методик використаних в роботі відповідно до поставлених завдань роботи. Автором наведено інформацію про різноманітні методи дослідження біологічної активності сполук, які були застосовані в роботі, а саме: комп'ютерне прогнозування біологічної активності (PASS-прогноз, QSAR-аналіз, молекулярний докінг), біологічні та біохімічні методи дослідження протимікробної дії, гострої токсичності, гіпоглікемічної, антиоксидантної та антирадикальної активності (*in vitro*), протипухлинної та фагоцитарної активності.

Статистична обробка отриманих результатів проведена з використанням сучасних методів, адекватних поставленим завданням. Застосування комплексу методів дозволило отримати достовірні результати.

У третьому розділі автором наводяться результати власних досліджень, які стосуються вивчення біологічної активності похідних ((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)карбонових кислот.

Автором проведено цілеспрямований пошук БАР на основі S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіолу, який базується на визначенні БАР даного ряду сполук та виявленні перспективних речовин для подальших біологічних досліджень. З метою створення комбінаторної бібліотеки та проведення цілеспрямованого синтезу автором здійснено віртуальний скринінг ряду S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіолу з використанням комп'ютерних програм (PASS-прогноз, SAR та QSAR-аналіз). Відібрано найбільш перспективні масиви сполук серед S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола як потенційних біорегуляторів для подальших біологічних досліджень. Побудовано SAR та QSAR-моделі

токсичності для S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола (гострої токсичності, антимікробної та протиракової активності), результати яких корелюють з експериментальними дослідженнями. Також було використано сторонні програмні рішення для створення моделей «структура – токсичність» та прогнозування LD₅₀ за допомогою вже створених моделей GUSAR. З'ясовано, що гостра токсичність похідних 7-хлорохінолін-4-тіолу знаходиться у діапазоні 200-800 мг/кг. Автором зроблено висновок, що ці сполуки належать до малотоксичних речовин (IV клас токсичності).

Вивчення антибактеріальної активності S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола на бактеріальних штамах трьох грамнегативних бактерій; *E. coli* ATCC 25922 (колекція американського типу культур), штам *E. coli* CRBR (клінічний ізолят гемолітичної кишкової палички резистентний до Карбеніциліну) і штам *E. coli* MDR (Ампіцилін, Оксацилін Офлоксацин, Цефтриаксон резистентний) встановило, що досліджені сполуки проявляють незначну протимікробну активність щодо досліджуваних штамів *E. coli* ATCC, *E. coli* CRBR та *E. coli* MDR.

Для дослідження протипухлинної активності обраних сполук автором проведено *in vitro* тестування з використанням кіназного домену СК₂ людини. Відібрано на основі молекулярного докінгу та експериментальних випробувань найбільш перспективні сполуки з найменшою вільною енергією зв'язування для протеїнкінази СК₂ за даними скоринг-функції для дизайну потенційних протиракових агентів. Встановлено, що найбільш перспективними сполуками є пептидоміметики (похідні ((гетерил)тіо)карбонових кислот, похідні цистеїну, гібриди на базі хіноліну та інших гетероциклів. Базові сполуки в експерименті похідних 7-хлорохіноліну виявляють невисоку протипухлинну дію.

Дослідження цитотоксичної (фітотоксичної) активності синтезованих сполук проводилось на проростках огірків *Cucumis sativus* L. сорту «Конкурент». Автором встановлено, що більшість досліджених похідних ((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)карбонових кислот при високих концентраціях (100-500 мкг/мл) проявляли значну фітотоксичну дію за показниками приросту

параметрів довжини гіпокотилію, довжини головного кореня, довжини зони росту бічних коренів та кількості бічних коренів проростків. При концентраціях 1-20 мкг/мл ці сполуки показали значний рістрегуляторний вплив, що перевищував вплив регуляторів росту рослин – Гібереліну та Епіну, серед яких найбільшу активність виявила 2-(7-хлорохінолін-4-ілтіо)ацетатна кислота (на 50-250 % порівняно з контролем).

Проведене автором дослідження гіпоглікемічної активності 4-S-похідних хіноліну на білих безпородних щурах свідчить, що найбільш перспективною сполукою в умовах експерименту *in vivo* є натрій 3-((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)пропіонат, яка знижує на 18 % базовий рівень глюкози.

Проведено дослідження антирадикальної активності S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіолу *in vitro*. Встановлено, що похідні 7-хлорохінолін-4-тіола на моделі аутоокиснення адреналіну виявили помірну активність в експерименті за показником швидкості реакції аутоокиснення адреналіну, що ґрунтується на інгібуванні активних форм кисню, і показано, що активність цих сполук поступається референс-антиоксиданту - Ацетилцистеїну.

Вивчено в умовах H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу захисну дію похідних ((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)карбонових кислот на сперматозоїди чоловіків за показниками фертильності сперми (швидкість, рух). Автором встановлено, що серед досліджуваних сполук, 2-((7-хлорхінолін-4-іл)тіо)сукцинатна кислота має високу захисну дію щодо сперматозоїдів чоловіків умовах H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу.

Проведено експериментальні дослідження *in vitro* фагоцитарної дії 4-S-похідних хіноліну з метою оцінки впливу похідних ((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)карбонових кислот на поглинальну функцію нейтрофілів периферичної крові, здатних до фагоцитозу часток дріждів, показали, що більшість похідних хіноліну не впливають на фагоцитарну активність нейтрофілів.

В результаті проведених досліджень, автором відібрано сполуки-лідери - 2-((7-хлорохінолін-4-іл)тіо)ацетатна кислота з вираженою рістстимулюючою на

рослинах активністю та 2-((7-хлорхінолін-4-іл)тіо)сукцинатна кислота з вираженою цитопротекторною дією щодо захисту сперматозоїдів.

Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Метою дисертаційної роботи А.М. Козир було пошук нових ефективних малотоксичних біорегуляторів у ряду S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіолу, дослідження їх біологічних властивостей, встановлення залежності між хімічною структурою і біологічною дією, вивчення впливу залишку тіокарбоновою кислоти у 4-му положенні хіноліну на прояв біологічної активності та токсичності.

Для досягнення поставленої мети автором створено комбінаторну бібліотеку сполук; проведено планування наукового експерименту на основі віртуального скринінгу біологічної активності S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола (за допомогою комп'ютерної програми PASS, TEST, GUSAR); експериментально досліджено прогнозований спектр біологічної дії S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола, що включає вивчення таких видів активності: протипухлинної; антибактеріальної дії; фітотоксичності (рістрегулюючої дії); гострої токсичності; антиоксидантної активності на моделях *in vitro*; гіпоглікемічної; фагоцитарної активності; встановлено закономірності залежності біологічної дії від хімічної структури S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола; визначено серед досліджених речовин сполуки-лідери (hit-compounds).

У дисертаційній роботі використані сучасні методи дослідження: хемометричні (PASS-прогноз, QSAR-аналіз, молекулярний докінг), біологічні та біохімічні методи дослідження протимікробної дії, гострої токсичності, гіпоглікемічної, антиоксидантної та антирадикальної активності (*in vitro*), протипухлинної та фагоцитарної активності.

Статистична обробка отриманих результатів проводилась за допомогою комп'ютерного комплексу програм. Одержані результати всебічно проаналізовані. Комплексне використання сучасних методів, статистична обробка дозволяють підтвердити достовірність отриманих даних.

Використання різноманітних сучасних методів для отримання експериментального матеріалу, проведений автором аналіз отриманих даних, дозволяють підтвердити обґрунтованість і достовірність наукових положень і висновків, які сформульовані в дисертації.

Повнота викладення основних наукових результатів роботи та апробація дисертації в опублікованих працях. За матеріалами дослідження опубліковано 21 наукову працю, в тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях (1 статтю включено до наукометричної бази даних Scopus) та 15 тезах доповідей на конференціях.

Результати роботи доповідалися і обговорювалися на XII університетській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених, (15-17 квітня 2019 року. м. Запоріжжя, Україна); XX міжнародній конференції студентів та аспірантів (15–17 травня 2019. м. Київ, Україна); *Topical issues of the development of modern science*, (16-18 жовтня 2019 року. м. Софія, Болгарія); *Сучасні проблеми біології, екології та хімії* (присвячена 90-річчю заснування ЗНУ, 16-17 жовтня 2020 р. Запоріжжя: ЗНУ, 2020); *Conference Proceedings of the 1st International Conference on Emerging Trends in Academic Research*; Міжнародної науково-практичної конференції «Наука, освіта, суспільство в умовах глобалізації» (6 липня 2021 р., м. Полтава); *Записки Української науково-дослідницької асоціації: тези доповідей Всеукраїнської конференції наукових дослідників* (Львів, 19-25 вересня 2021 року); XV університетській науково-практичній конференції студентів, аспірантів, докторантів і молодих вчених (8-22 квітня 2022 року. Запорізький національний університет); *Proceedings of the 2 nd International Scientific and Practical Conference «Modern Scientific Trends and Standards» Scientific Collection «InterConf»*, 98 (February 16- 18, 2022). Santa Rosa, Argentina: Megafyn; *III internationalen wissenschaftlich-praktischen Konferenz «Grundlagen der modernen wissenschaftlichen Forschung»*, *Collection of Scientific Papers «ΛΟΓΟΣ»*, (March 31, 2023; Zurich, Switzerland); *Sectoral research XXI: characteristics and features: collection of scientific papers «SCIENTIA» with Proceedings of the V International*

Scientific and Theoretical Conference, (February 3, 2023. Chicago); V International Scientific and Practical Conference, *Collection of scientific papers «ΛΟΓΟΣ»*, (August 18, 2023; Cambridge, UK); 33th International scientific and practical conference "Modern scientific technologies and solutions of scientists to create the latest ideas" (August 22-25, 2023), London, Great Britain; II International Scientific and Theoretical Conference «Scientific method: reality and future trends of researching», (August 25, 2023; Zagreb, Croatia); VII Міжнародній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 25-27 квітня 2024 року).

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації. У цілому матеріали у дисертаційній роботі викладено логічно, послідовно і з необхідним ступенем деталізації. Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому позитивно, я хочу зазначити, що принципових зауважень у мене немає. Разом з тим, я хочу висловити деякі окремі зауваження та запитання, які жодним чином не впливають на позитивну оцінку роботи і не знижують її теоретичну та практичну значність:

1. У розділі «Анотація» у підрозділі «Наукова новизна отриманих результатів» автором зазначено, що досліджені сполуки, які володіють цитотоксичною (фітотоксичною) активністю, можна застосовувати у рослинництві у ролі пестицидів для сільськогосподарських рослин. Проте, замість терміну «пестициди» більш коректно застосовувати термін «гербіциди», які використовують в рослинництві для гальмування росту рослин.

2. Аналогічне зауваження стосується термінів «фітотоксичність» та «цитотоксичність», яких автор помилково відносить до рістстимулюючої активності сполук на рослинах, проте, «фітотоксичність» та «цитотоксичність» належать до ретардантної, тобто, гальмуючої ріст рослин активності.

3. Деякі назви хімічних сполук, які досліджувала автор, вельми рідко застосовуються у хімічній термінології, автору доцільно вживати більш відомі назви сполук. Наприклад, замість назви - сукцинатна кислота краще вживати

назви - бурштинова кислота, або янтарна кислота, або бутандіова кислота, або етан-1,2-дикарбонова кислота (за номенклатурою IUPAC).

4. У розділі «Огляд літератури» по тексту зустрічаються нечітко сформульовані речення, сенс яких не зовсім зрозуміло. Наприклад, на стор. 31 наведене не зовсім зрозуміле речення: «Протипухлинна активність деяких похідних хіноліну при гідролізі розщеплює або відновлює зв'язки в пухлинних клітинах значно підвищується і, порівняно з іншими алкільованими препаратами, виявляє більш виражену тропну дію». Автору слід більш чітко сформулювати, що мається на увазі.

5. У розділі «Огляд літератури» автором описано біологічні властивості 4-тіопохідних хіноліну, але опис деяких досліджень автором надано вельми скорочено, в результаті, виникають зауваження методичного характеру. Наприклад, автором не зазначено, в яких умовах проводилось дослідження антибактеріальної дії сполуки 4-меркапто-2-метилхінолін, представлене на стор. 31 та антивірусної дії 4,7-дихлорохіноліну, представлене на стор. 36. Також на стор. 38 автором не зазначено, яким саме замісником був заміщений гідразон у 3-му положенні, що виявив найкращу цитотоксичну активність. Аналогічне зауваження стосується речення, яке представлене на стор. 40, де зазначається про препарати, які діють в крові життєвого циклу паразита з роду *Plasmodium*. Автором не зазначено, які це були препарати і на які саме молекули-мішені вони діють в крові паразита.

6. У розділі «Матеріали та методи», автором надано на стор. 57 опис методу дослідження цитотоксичної активності сполук на рослинах огірка, в якості препаратів для порівняння рістстимулюючої активності сполук було обрано відомі рістстимулятори Епін та Гіберелін. Виникає питання, чому автором обрано саме ці рістстимулятори? Однак, в цьому біотесті автору доцільно було б також провести порівняльний аналіз рістстимулюючої активності хімічних сполук з фітогормоном ауксином, наприклад, ІОК (1*H*-індол-3-іл)оцтова кислота), який як відомо регулює процеси розтягнення та поділу клітин коренів та пагонів рослин.

7. У розділі «Матеріали та методи», автором надано на стор. 61 опис методу дослідження гіпоглікемічної активності на щурах. Зазначено, що речовини тестували на п'яти тваринах кожно. З цього речення не зовсім зрозуміло, що автор має на увазі, чи було використано п'ять тварин у кожному експерименті?

8. У розділі «Результати та обговорення» представлені результати визначення біологічної дії не всіх сполук серед S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіолу, які були досліджено у роботі. Автору слід пояснити, чому обрано саме ці сполуки, за якими представлено результати досліджень?

9. У розділі «Результати та обговорення» на стор. 80 автором надано не зовсім коректне тлумачення відносно захворювання, яке спричиняє рак. Автор стверджує, що рак - це аномальне захворювання клітинного циклу, що не контролюється і характеризується швидкою проліферацією нормальних клітин. Проте, це тлумачення є не зовсім коректним, оскільки за даними літератури, рак - це аномальне порушення клітинного циклу, і він характеризується втрачанням спеціалізації диференційованих клітин та переродженням їх у недиференційовані клітини, які втратили спеціалізацію та мають швидку проліферацію і морфологічну структуру, яка відрізняється від нормальних клітин. Однак, це зауваження має виключно теоретичний характер.

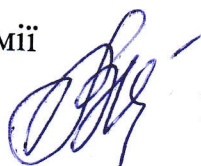
10. По тексту дисертаційної роботи зустрічаються дрібні граматичні, стилістичні та друкарські помилки.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Дисертаційна робота Козир Анни Михайлівни на тему «Біологічна активність S-заміщених 7-хлорохінолін-4-тіола», повністю відповідає вимогам, передбаченим «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 року № 44 (зі змінами), та вимогам щодо оформлення дисертацій, визначеними наказом

Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40, а її автор Козир Анна Михайлівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія (галузь знань 09 - Біологія).

Офіційний опонент

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу хімії біоактивних азотовмісних
гетероциклічних сполук
Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В. П. Кухаря НАН України



Вікторія ЦИГАНКОВА

