

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Добродуб Інги Валеріївни

«Біологічна активність (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтіо)карбонових кислот та їх похідних», поданої до спеціалізованої вченої ради Д 26.220.01

в інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України ім. В. П. Кухаря

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія

Актуальність теми дисертації. Створення ефективних антибактеріальних агентів та протипухлинних препаратів є актуальним завданням і пріоритетним напрямком біоорганічної хімії.

Не зважаючи на великий вибір антибактеріальних препаратів, на даний час залишається актуальною проблема розробки нових ефективних препаратів селективної дії. Це обумовлено все зростаючим рівнем резистентності мікроорганізмів до існуючих лікарських та дезінфікуючих препаратів, формуванням і подальшим розвитком стійкості до існуючих антисептиків, що нівелює або знижує їх ефективність. Перспективними сполуками для розробки нового покоління ефективних антибактеріальних та протипухлинних препаратів є похідні хіноліну, які застосовуються у біології, медицині. Відома їх висока антимікробна активністю проти широкого спектру патогенних бактерій.

Одним із підходів до вирішення проблем створення сучасних препаратів є хемометричні дослідження, що дозволяють здійснити апріорну оцінку властивостей хімічних сполук у поєднанні з експериментальними дослідженнями. Тому віртуальні моделювання та експериментальні дослідження антимікробних і токсичних властивостей нових сполук цього ряду як потенційних біоцидів було одним з актуальних завдань даної дисертаційної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт Запорізького національного університету за темою, що фінансується з державного бюджету України «Створення біологічно активних речовин на основі N- та S-заміщених шестичленних азотовмісних гетероциклів» (№ 0212U003062) у рамках пріоритетного наукового напрямку «Створення нових біологічно активних речовин на основі азагетероциклів та визначення механізмів їх дії» лабораторії біотехнології фізіологічно активних речовин Запорізького національного університету.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність. На основі зібраних та проаналізованих даних літератури визначені основні тенденції розвитку і застосування антибактеріальних препаратів похідних хіноліну. Узагальнено інформацію щодо антимікробних та антиоксидантних властивостей (2-R-хінолін-4-ілтіо)карбонових кислот як перспективних універсальних синтонів для подальшого створення ефективних препаратів.

Систематизація та узагальнення літературних даних стосовно похідних хіноліну дало можливість сформулювати мету та задачі досліджень даної дисертаційної роботи.

Для інтерпретації результатів досліджень використані сучасні експериментальні та хемометричні методи, загальноприйняті та коректні підходи до встановлення біологічних властивостей ряду (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтіо)карбонових кислот та їх похідних. Достовірність отриманих автором результатів не викликає сумніву.

Наукові положення, висновки та рекомендації дисертаційної роботи базуються на експериментальних даних, логічно витікають з отриманих результатів. Висновки, викладені дисертантом, чіткі та конкретні.

Вважаю, що поставлені в роботі завдання реалізовані повною мірою на високому науковому рівні. При виконанні та написанні дисертаційної роботи автор дотримувався принципів академічної доброчесності.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше охарактеризовано взаємозв'язок між будовою (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтіо)карбонових кислот та їх похідних і їх біологічними властивостями. Розроблено комбінаторну бібліотеку та проведені хемометричні дослідження ряду (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтіо)карбонових кислот та їх похідних. Відібрано найбільш перспективні масиви сполук для подальшого синтезу та біологічних випробувань. Розроблені в цій роботі моделі можуть бути використані для прогнозування антимікробної дії нових сполук. Продемонстровано ефективність хімічної модифікації 2-го та 4-го положення хіноліну, як одного із методів зниження їх токсичності. На основі отриманих результатів *in silico* (віртуального скринінгу та QSAR аналізу) вперше було визначено ряд чинників, які впливають на рівень токсичної дії в ряду похідних (хінолін-4-ілсульфаніл)карбонових кислот та визначено напрямки створення найбільш нетоксичних сполук. Результати проведених експериментальних досліджень свідчать, що 6-заміщені 4-тіопохідні відносяться до помірно або малотоксичних речовин.

На основі спектральних даних та молекулярного докінгу продемонстровано потенційні механізми властивості інгібіторів GyrB, наявність активності щодо чутливих до *E. coli* (ATCC) та мультирезистентних штамів. Було виділено 12 сполук для протеїнкінази CK2 та 9 сполук для FGFR1 із найменшою вільною енергією зв'язування за даними скоринг-функції та наявністю водневих зв'язків із відповідними амінокислотними залишками, що характерні для кіназних інгібіторів. Досліджені сполуки з високою долею вірогідності можуть бути інгібіторами відповідних протеїнкіназ.

У дослідях *in vitro* низка похідних хіноліну проявляють АО властивості у якості «пасток» супероксиданіону у водній фазі. Найбільш ефективними є сполуки без замісника в 6-му положенні хіноліну та похідні з електронодонорними групами.

Вперше досліджено захисну дію похідних (2-R-хінолін-4-ілтіо)карбонових кислот щодо сперматозоїдів чоловіків в умовах H₂O₂-індукованого окисного стресу (ОС). Показано високу захисну дію сполук з

електронодонорними групами (метокси-, етоксигрупа) та фтору в 6-му положенні.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи вказують на те, що (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтїо)карбонових кислот та їх функціоналізовані похідні є перспективними кандидатами для розробки малотоксичних антибактеріальних препаратів щодо чутливих до *E. coli* (ATCC) та мультирезистентних штамів. Розроблені QSAR-моделі інгібіторів GyrB можуть в подальшому використовуватися для розробки нових засобів проти *E. coli*.

Встановлені закономірності «структура - активність - токсичність» (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтїо)карбонових кислот та їх похідних можуть бути використано для пошуку, конструювання та спрямованого синтезу нових антимікробних препаратів.

Розроблено препаративні методи синтезу та створено комбінаторну бібліотеку нових похідних (2-R-хінолін-4-ілтїо)карбонових кислот.

Отримані результати біологічних досліджень дозволили рекомендувати сполуки – 2-(6-етокси-2-метилхінолін-4-ілтїо)- та 2-(6-флуоро-2-фенілхінолін-4-ілтїо)сукцинати для подальшого поглибленого дослідження як перспективних препаратів для підвищення якості репродуктивного здоров'я чоловіків і при процедурі екстракорпорального запліднення.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів, їх узагальнення та інтерпретація. Постановка задач та обговорення результатів проводилось спільно з науковим керівником – науковим керівником д.б.н., проф. Бражко О.А.

Синтетичні експериментальні дослідження виконано спільно з науковим керівником д.б.н., проф. О.А. Бражко та к.б.н., доц. М.П. Завгороднім. Вивчення антимікробних властивостей ПХ проведено за участю канд. мед. наук В.М. Благодатного – доцента кафедри мікробіології і епідеміології Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика. Молекулярний докінг похідних (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтїо)карбонових кислот проведено к.х.н. В.Г. Бджолою (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ). Токсикологічне тестування та комп'ютерне QSAR моделювання біологічної активності досліджених сполук проведено на науково-матеріальній базі відділу медико-біологічних досліджень інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України дисертантом (зав. відділом, к.б.н. Метелиця Л.О.).

Результати робіт, що опубліковані у співавторстві та увійшли до дисертаційної роботи, одержані здобувачем особисто.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих роботах і авторефераті. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано опубліковано 30 наукових робіт, з них: 6 статей у наукових фахових виданнях (1 статтю включено до наукометричної БД Scopus), 2 патенти на корисну модель та 22 тез доповідей.

Публікації та автореферат повністю відображають основний зміст роботи. Оформлення роботи та автореферату відповідає вимогам Державних стандартів України.

Аналіз дисертаційної роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, власних результатів та їх обговорення, висновків та списку використаних джерел (206 найменувань). Дисертаційну роботу викладено на 201 сторінках друкованого тексту, містить 28 таблиць та 41 рисунок.

Дисертаційна робота оформлена акуратно. Матеріал роботи викладено послідовно, доступно і проілюстровано рисунками, схемами. Застосована в роботі наукова термінологія є загальноновизнаною, стиль викладення результатів теоретичних і практичних досліджень, нових наукових положень, висновків і рекомендацій забезпечує доступність їх сприйняття та використання.

У *першому розділі* «Літературний огляд. Біологічна активність S-заміщених 4-меркаптохіноліну: тенденції розвитку та застосування тощо (26 сторінок) автор провів аналіз літературних джерел про сучасний стан та тенденції розвитку та використання препаратів на основі похідних хіноліну. Особливу увагу було приділено властивостям (2-R-хінолін-4-ілтіо)карбонових кислотам та їх похідним як перспективних біорегуляторів із широким спектром антимікробної активності. Дана оцінка токсикологічних характеристик похідних хіноліну відносно тест-об'єктів та організмів різного трофічного і системного рівня. Проаналізовано сучасний стан цих речовин як потенційних антиоксидантів, що впливають на процеси вільнорадикального окиснення (ВРО). Дослідження та аналіз анти/прооксидантних властивостей нових сполук є важливим етапом їх розробки та розуміння механізму дії і прогнозування можливих неочікуваних негативних результатів.

Дисертант показав, що дослідження в даному напрямку є виправданими та актуальними.

У *другому розділі* «Методологія, матеріали та методи дослідження» (20 сторінок) було представлено матеріали, що вивчались. Це досліджені речовини, мікроорганізми, тварини. Хемометричні дослідження біологічного потенціалу похідних (хінолін-4-ілтіо)карбонових кислот здійснено з використанням комп'ютерної програми PASS (Д. А. Филимонов, В. В. Поройков, 2006), за допомогою ОСНЕМ для прогнозування на основі різних методик машинного навчання та широкого спектру молекулярних дескрипторів.

Вивчення токсичності проводили відповідно до методики гострої токсичності за стандартом Пассіно та Сміта у ракоподібних *D. Magna* та на дорослих мишах обох статей. Середні летальні дози ЛД₅₀ визначали за експрес-методом Прозоровського (В. Б. Прозоровський, 1991).

АОА *in vitro* вивчалася на моделі ініціації утворення вільних радикалів: в умовах індукції супероксид-радикалу та накопичення активних форм оксиду азоту (Ю. І. Губський, В. В. Дунаєв і співавт., 2002).

Для проведення оцінки захисту *in vitro* сперматозоїдів чоловіків різної фертильності від H₂O₂-індукованого окислювального стресу у сперматозоїдах дослідження використовують нативний матеріал – еякуляти фертильних чоловіків (Donnelly E.T. et al., 1999).

У **третьому розділі** «Хемометричні дослідження (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот та їх похідних» (10 сторінок) наведено результати експериментальних та хемометричних досліджень. Аналіз віртуальних досліджень засвідчив, що (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислоти та їх похідні є перспективними речовинами з антибактеріальними, протипухлинними, цитопротекторними властивостями.

Дисертантом виявлено певні закономірності та відібрано найбільш перспективні масиви сполук для подальшого синтезу та біологічних випробувань.

Автором в **четвертому розділі** «Синтез і фізико-хімічні властивості (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот та їх похідних» представлено препаративні методи синтезу найбільш перспективних функціональних похідних (2-R-хінолін-4-ілтію)карбонових кислот, а саме синтезовано кислоти, водорозчинні солі, естери. Досліджено спектральні характеристики сполук та підтверджено їх будову.

У **п'ятому розділі** «Вивчення зв'язку між хімічною будовою та біологічною активністю в ряду похідних (2-R-хінолін-4-ілтію)карбонових кислот представлено результати біологічних досліджень, які свідчать, що ряд досліджених сполук є перспективним молекулярним каркасом для дизайну потенційних протиракових та протимікробних агентів. Продемонстровано ефективність хімічної модифікації по другому та четвертому положенню хіноліну як одного із методів зниження їх токсичності. Заслужовує на увагу цитотоксичний ефект сполуки – 6-метокси-2-фенілхінолін-4-тіол, що має фенільний замісник у 2-му положенні структури хіноліну

У дослідях *in vitro* ряд похідних проявляють антиоксидантні властивості в якості «пасток» супероксид аніону у водній фазі. Найбільш ефективними є сполуки без замісника в 6-му положенні хіноліну та похідні з електронодонорними (метокси-, етокси-) групами, а введення атома галогену (фтору) в більшості випадків призводить до зниження антиоксидантних властивостей.

Вперше досліджено захисну дію похідних (2-R-хінолін-4-ілтію)карбонових кислот щодо сперматозоїдів чоловіків в умовах H_2O_2 -індукованого окисного стресу (ОС). Показано високу захисну дію сполук з електронодонорними алкоксигрупами та при наявності фтору в 6-му положенні. Вперше проведено *in vitro* оцінку впливу нових біологічно активних сполук – похідних (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот – на поглинальну функцію нейтрофілів периферичної крові, здатних до фагоцитозу.

У **шостому розділі** «Дослідження біологічної дії найбільш активних похідних (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот» приведено поглиблені біологічні дослідження декількох високоактивних сполук: 2-(2-метил-6-етоксихінолін-4-ілтію)сукцинату (**28**), яка малотоксична, проявляє виражені антирадикальні та АО властивості; 2-(6-флуоро-2-фенілхінолін-4-ілтію)сукцинату (**30**), що має високу захисну дію щодо сперматозоїдів чоловіків в умовах H_2O_2 -індукованого ОС; 3-(2-метилхінолін-4-ілтію)пропаноату (**17**) з вираженими антибактеріальними властивостями проти мультірезистентних штамів *E. coli*.

Робота Добродуб Інги Валеріївни наповнена значним фактичним матеріалом, оригінальними сучасними підходами до вирішення поставлених завдань. Висновки автора ґрунтуються на достовірному фактичному матеріалі.

Автореферат дисертації та наукові публікації Добродуб І.В. достатньо повно відображають зміст роботи.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці.

Результатом дисертаційного дослідження Добродуб І.В. за темою «Біологічна активність (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот та їх похідних» є підтвердження важливого чинника прояву високого рівня антимікробних властивостей - інгібування GyrB за рахунок утворення різних зв'язків з амінокислотними залишками та йоном магнію в активному центрі ферменту. Сполуки – 2-(2-метилхінолін-4-ілтію)- та 3-(2-метилхінолін-4-ілтію)пропанові кислоти (**9, 17**) з найвищим рівнем дії щодо *E. coli* – утворюють найбільш стійкі лігандно-білкові комплекси з $\Delta G = -8,66, -7,84$ ккал/моль пропонуються для практичного використання як антимікробні препарати.

Отримані результати дозволили рекомендувати сполуки – 2-(6-етокси-2-метилхінолін-4-ілтію)- та 2-(6-флуоро-2-фенілхінолін-4-ілтію)сукцинати для подальшого поглибленого дослідження як перспективних препаратів для підвищення якості репродуктивного здоров'я чоловіків і при процедурі екстракорпорального запліднення.

Високо оцінюючи експериментальний рівень дисертаційної роботи, слід, проте, **відмітити деякі зауваження та пропозиції:**

1. Автором недостатньо висвітлено перспективність похідних (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот – для боротьби із мікроорганізмами, що викликають інші інфекційні захворювання?
2. За яким принципом комплектувалася достатньо велика вибірка похідних (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот, що їх об'єднує?
3. Чому антиоксидантна активність визначалась саме за дією на супероксид-аніон, а не інших маркерів? Наприклад, за впливом на рівень малонового діальдегіду?
4. Чому як препарат порівняння при вивченні захисної дії похідних (2-R-хінолін-4-ілтію)карбонових кислот щодо сперматозоїдів чоловіків в умовах H_2O_2 -індукованого окисного стресу було обрано ацетилцистеїн? Як концентрація досліджених речовин впливала на прояв АО властивостей?

Наведені зауваження не є такими, що впливають на загальну позитивну оцінку роботи, яка є завершеним самостійним дослідженням. Дисертація виконана на високому науковому рівні та є логічно завершеною працею.

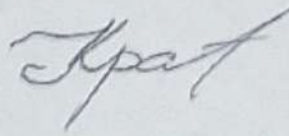
На підставі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота **Добродуб Інги Валеріївни** «Біологічна активність (2-метил(феніл)хінолін-4-ілтію)карбонових кислот та їх похідних» є завершеною науковою роботою і за актуальністю тематики, обсягом виконаних досліджень, новизною отриманих результатів, ступенем обґрунтованості наукових положень і рекомендацій, результатами впровадження, повнотою викладення результатів роботи у фахових виданнях, теоретичним і практичним значенням **відповідає** вимогам

Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України 567 від 24.07.2013 р. (із змінами, внесеними згідно з постановами № 656 від 19.08.2015 р. і № 1159 від 30.12.2015 р.) та вимогам, які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор Добродуб Інга Валеріївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 02.00.10 – біоорганічна хімія.

Офіційний опонент:

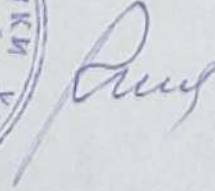
завідувачка кафедри органічних і фармацевтичних технологій
Одеського національного політехнічного університету
МОН України.

доктор біологічних наук, професор



I.A. Кравченко

Підпис засвідчую
Вчений секретар ОНЦУ



В.І.Шевчук