

## ВІДГУК

офіційного опонента професора кафедри фармацевтичної хімії, доктора фармацевтичних наук Северіної Ганни Іванівни на дисертаційну роботу **Гойдика Михайла Володимировича** на тему «Синтез та біологічна активність нових хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів та їх 3-заміщених похідних», подану у спеціалізовану вчену раду ДФ 35.600.146 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України, що утворена для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»

**Актуальність теми.** Дисертаційна робота Гойдика Михайла Володимировича присвячена актуальній проблемі сучасної фармацевтичної хімії – синтезу та вивченню біологічної активності нових гетероциклічних сполук похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів як потенційних протисудомних і протипухлинних агентів. Актуальність дисертаційної роботи окреслюється сучасними викликами медичної та фармацевтичної науки, пов'язаними з необхідністю створення нових ефективних і безпечних лікарських засобів для лікування соціально значущих захворювань, зокрема епілепсії та онкологічної патології. Попри значний прогрес фармакотерапії, близько третини хворих на епілепсію залишаються фармакорезистентними до існуючих протисудомних препаратів, а застосування протипухлинних засобів часто супроводжується вираженою токсичністю та розвитком резистентності пухлинних клітин. У зв'язку з цим пошук нових хімічних сполук із оригінальними механізмами дії та сприятливим профілем безпеки є безумовно актуальним науковим напрямом.

Перспективним підходом у сучасній медичній хімії є дизайн і синтез нових гетероциклічних систем, здатних проявляти мультифункціональну біологічну активність. Тіазольні та тіопіранові фрагменти входять до складу численних біологічно активних молекул і лікарських засобів, що обґрунтовує доцільність створення конденсованих тіопірано-тіазольних структур як потенційних фармакологічних агентів. Використання доміно- та мультикомпонентних реакцій у синтезі таких систем відповідає сучасним тенденціям «зеленої хімії», спрямованим на підвищення економічності, скорочення стадійності процесів та зменшення витрат ресурсів.

Варто підкреслити, що виконане дослідження не є ізольованим пошуковим проектом, а ґрунтується на потужній науковій платформі,

сформованій у межах відомої школи медичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького під керівництвом професора Романа Богдановича Лесика. Упродовж тривалого часу в зазначеному науковому колективі здійснювалися системні дослідження різноманітних гетероциклічних систем, із поглибленим аналізом взаємозв'язків «структура – біологічна активність». Накопичений масив експериментальних даних щодо впливу електронних, стеричних, ліпофільних параметрів замісників, характеру конденсованих циклічних фрагментів, типу гетероатомів та просторової організації молекул на фармакологічний профіль сполук створив концептуальне підґрунтя для раціонального молекулярного дизайну нових похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів.

Отже, тема дисертаційної роботи є своєчасною, науково обґрунтованою та відповідає актуальним потребам розвитку фармацевтичної науки, а її актуальність зумовлена методологічною наступністю та інтеграцією у сформований науковий напрям, що характеризується системністю, міждисциплінарністю та орієнтацією на створення біологічно валідованих гетероциклічних структур із прогнозованою активністю.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційна робота виконана відповідно до плану комплексної науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (державна реєстрація 0121U107504) та в рамках виконання проєкт ДБ/ПРОТЕП (державна реєстрація № 0125U001794).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Наукова новизна роботи є беззаперечною та ґрунтується на її магістральному результаті – цілеспрямованому синтезі та комплексному дослідженні нових, раніше неописаних у науковій літературі похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів, що характеризуються виразними поліфункціональними фармакологічними властивостями та розглядаються як перспективні лікоподібні структури.

Доцільно виокремити декілька ключових аспектів наукової новизни рецензованого дослідження:

- розроблено раціональні синтетичні стратегії одержання хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазольних систем із використанням каскадних перетворень, що забезпечують структурну різноманітність та варіативність замісників;
- встановлено закономірності взаємозв'язку «структура – біологічна активність» для конденсованих тіопіранотіазольних систем, зокрема впливу 4-хлорофенілпропіонамідного замісника на рівень протисудомної активності;

- експериментально підтверджено поліфункціональний фармакологічний профіль синтезованих сполук, що проявляється у поєднанні протисудомної активності з цитотоксичною дією щодо окремих пухлинних клітинних ліній;
- обґрунтовано можливі молекулярні механізми дії досліджуваних сполук шляхом поєднання *in vivo* та *in silico* підходів, що дозволило підвищити валідність отриманих результатів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Практичне значення дисертаційної роботи полягає у створенні нової серії конденсованих похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів, що можуть розглядатися як перспективні структурні платформи для подальшого пошуку та оптимізації біологічно активних речовин із протисудомним та протипухлинним потенціалом. Отримані результати мають прикладне значення у кількох напрямках.

По-перше, розроблено та експериментально апробовано ефективну синтетичну методологію одержання нових гетероциклічних систем, що може бути використана для цілеспрямованої модифікації структури та розширення бібліотеки похідних даного класу. Запропонований підхід створює можливості для подальшої структурної диверсифікації та оптимізації фармакологічного профілю сполук.

По-друге, виявлені сполуки з вираженою протисудомною активністю можуть слугувати хітами або структурами-лідерами для подальших доклінічних досліджень. Результати біологічного скринінгу розширюють уявлення про фармакологічний потенціал досліджуваного класу сполук та відкривають перспективи їх подальшого вивчення як можливих протисудомних, протипухлинних агентів або молекул із комбінованим профілем дії.

По-третє, використання комплексного підходу (органічний синтез – фізико-хімічна ідентифікація – *in vivo* та *in vitro* дослідження – *in silico* аналіз) демонструє модель ефективної організації ранніх етапів доклінічного пошуку лікарських засобів, що може бути впроваджена у практику науково-дослідних лабораторій фармацевтичного профілю.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, їх достовірність.**

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків дисертаційної роботи є достатньо високим і визначається логічною побудовою дослідження, коректністю використаних експериментальних підходів та комплексністю застосованих методів.

Наукові положення дисертації базуються на результатах цілеспрямованого органічного синтезу похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів, структурна ідентифікація яких підтверджена сучасними фізико-хімічними методами аналізу, зокрема  $^1\text{H}$  та  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопія, LC-MS, для окремих представників – рентгеноструктурний аналіз. Використання сукупності методів забезпечує достовірність встановлення будови синтезованих сполук.

Обґрунтованість фармакологічних висновків підтверджується як застосуванням валідованих експериментальних моделей протисудомної активності, зокрема PTZ-індукованих судом, що є загальноприйнятими у доклінічному скринінгу потенційних протисудомних агентів, так і статистично достовірними результатами.

Дані щодо цитотоксичної активності, отримані в межах міжнародного скринінгу (панель NCI-60), є методично обґрунтованими та відповідають сучасним стандартам первинної оцінки протипухлинного потенціалу нових хімічних сполук.

Таким чином, представлені у роботі наукові положення, висновки та практичні рекомендації є обґрунтованими, експериментально підтвердженими та характеризуються належним рівнем достовірності.

#### **Повнота викладення дисертації в опублікованих працях.**

Основні положення та результати дисертації повною мірою відображені в опублікованих працях автора. Результати дослідження опубліковано у журналах, індексованих у міжнародних наукометричних базах даних, зокрема високорейтингових *Scientia Pharmaceutica* та *Archiv der Pharmazie* (Q2), а також у двох статтях у *ScienceRise: Pharmaceutical Science* (Q3).

Публікації охоплюють ключові аспекти роботи – синтез сполук, їх ідентифікацію та фармакологічну активність і відповідають вимогам щодо апробації результатів дисертаційних досліджень.

Матеріали дисертації також пройшли апробацію на наукових конференціях різного рівня, що забезпечило їх фахове обговорення у професійному середовищі.

Таким чином, дисертаційна робота повною мірою відображена в опублікованих працях, а кількість і рівень публікацій відповідають чинним вимогам щодо апробації результатів дисертаційних досліджень.

**Оцінка структури та змісту дисертації.** Дисертація відповідає вимогам до оформлення дисертації, затвердженими наказом Міністерства освіти та науки № 40 від 12.01.2017 р. Дисертація має класичну структуру, викладена на 190 сторінках друкованого тексту, з яких 112 основного тексту. Список використаних джерел містить 180 англійських джерел.

**Перший розділ** у дисертації – це літературний огляд, присвячений доміно-реакціям Кньювенагеля-гетеро-Дільса-Альдера в органічному синтезі та медичній хімії та обґрунтуванню доцільності їх використання для конструювання біологічно активних гетероциклів. Починається з постановки доміно/каскадних/тандемних реакцій як методології, що дозволяє в одній синтетичній операції послідовно сформувати кілька зв'язків і швидко отримувати складні каркаси, що важливо саме для отримання бібліотек молекул у медичній хімії. Підрозділ 1.2 формує аргументацію, що каркас тіопірано[2,3-d]тіазолу є перспективним як платформа для дизайну біологічно активних малих молекул. Огляд характеризується глибиною аналізу, логічною структурованістю та критичним осмисленням літературних джерел та формує чітке теоретичне підґрунтя для постановки мети та завдань дослідження.

Перший розділ фактично задає «рамку» для наступних частин дисертації: після такого огляду логічно виглядає перехід до **Розділу 2**, де вже описано «Синтез та хімічні перетворення конденсованих хромено-тіопірано-тіазолів та їх біологічна активність», тобто від теорії та літературних підходів до власних експериментальних серій. Другий розділ є центральним експериментальним розділом і присвячений синтезу, хімічним перетворенням та біологічному дослідженню похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів. У розділі послідовно представлено розробку та оптимізацію синтетичних підходів до одержання цільових конденсованих гетероциклічних систем, характеристику умов реакцій, їх виходів, відтворюваності та хімічної доцільності, фізико-хімічну ідентифікацію синтезованих сполук із застосуванням сучасних методів аналізу, результати фармакологічного скринінгу, зокрема дослідження протисудомної активності у валідованих експериментальних моделях, оцінку цитотоксичної активності окремих сполук. Вагомим доповненням експериментальної частини роботи є проведені *in silico* дослідження, зокрема молекулярний докінг та прогнозування стабільності комплексу синтезованих похідних хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів до потенційних біомішеней. Застосування комп'ютерного моделювання дозволило теоретично обґрунтувати можливі механізми протисудомної дії та пояснити встановлені експериментально закономірності «структура – біологічна активність».

У **третьому розділі** представлено результати синтезу тіопірано-тіазольних сполук та їх 3-заміщених похідних із подальшою оцінкою протипухлинної активності. Автором обґрунтовано вибір структурних модифікацій та продемонстровано можливість цілеспрямованого варіювання хімічної будови. Біологічне дослідження виконано з використанням валідованих міжнародних методик (панель NCI-60), що забезпечує

достовірність і порівнюваність результатів. Проведено первинний аналіз взаємозв'язку «структура – протипухлинна активність». Розділ характеризується логічною побудовою, системністю та належним науково-методичним рівнем виконання.

У четвертому розділі дисертації представлено результати структурної модифікації тіопірано-тіазольних систем та розширення хімічного простору досліджуваного класу сполук. Розроблено ефективний підхід до одержання 3-заміщених похідних шляхом алкілювання в умовах ДМФА/К<sub>2</sub>СО<sub>3</sub>, що забезпечує задовільні виходи та відтворюваність. Синтезовано серію нових сполук із варіюванням ароматичних замісників, що розширює структурне різноманіття та потенційний біологічний профіль. Ефективність доміно-реакції Кньовенагеля–гетеро-Дільса–Альдера підтверджена для побудови ізотіохромено-тіазольного каркаса. Структуру одного з представників остаточно підтверджено рентгеноструктурним аналізом, що засвідчує достовірність встановленої будови.

#### **Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.**

Загальна оцінка дисертаційної роботи є беззаперечно позитивною. Представлене дослідження вирізняється високим рівнем наукової зрілості, глибиною теоретичного опрацювання проблеми та ґрунтовністю експериментального виконання. Робота демонструє цілісність наукової концепції від обґрунтованого вибору синтетичної стратегії до переконливої біологічної верифікації одержаних результатів. Дисертація характеризується потужною експериментальною базою, системністю викладу, коректним застосуванням сучасних методів структурної ідентифікації та біологічного скринінгу. Особливої відзнаки заслуговує інтеграція органічного синтезу, фармакологічних досліджень та *in silico* підходів, що свідчить про міждисциплінарний характер роботи та відповідність сучасним тенденціям медичної хімії.

Робота справляє враження цілісного, виваженого і науково вагомого дослідження, результати якого мають як фундаментальне, так і прикладне значення та можуть бути використані як підґрунтя для подальших доклінічних розробок. Поряд з позитивними характеристиками дисертації варто зазначити деякі зауваження:

1. стр. 68. на рис. 2.5 спектр позначено як LC-MS, однак зображені лише мас-спектри без хроматографічного профілю та інтеграційних даних.
2. стр. 72-73 у розділі 2, присвяченому моделі scPTZ, спостерігається неузгодженість щодо статі експериментальних тварин (вказано «самці», однак далі зазначено про приблизно однакову кількість самців і самок). З

огляду на можливий вплив статі на судомний поріг та фармакологічну відповідь, доцільним було б чіткіше окреслити дизайн експерименту.

3. стр. 120 синтез водорозчинної метансульфонатної солі 3.5 обґрунтовується як «підвищена розчинність у воді полегшує їх застосування у біологічних дослідженнях, а також може позитивно впливати на біодоступність» хоча подальші фармакологічні дослідження не проводилися ні для сольової форми 3.5, ні для основи 3.4;
4. стр. 137 різноманітність хімічної функціоналізації похідних у 4 розділі не підкріплена фармакологічним скринінгом, що обмежило можливість визначення доцільності введення тих чи інших фрагментів та встановлення закономірностей «структура-активність».
5. результатами молекулярного докінгу:
  - конформаційне розміщення та аналіз взаємодій з амінокислотними залишками наведено лише для сполуки 2.14, для двох інших “хітів” лише афінність;
  - використані у роботі розміри grid box  $60 \times 60 \times 60$  Å більше відповідає підходу частково “blind docking”, що може знижувати специфічність позиціонування лігандів;
  - не наведені координати центрів ґраткового поля (grid box) для усіх біомішеней, що унеможлиблює відтворення дослідження;

5. Зустрічаються друкарські помилки та неточності, наприклад у змісті пропуск нумерації (2.7), дублювання назв підрозділів «Молекулярний докінг», у переліку скорочень дублюється EDDA та некоректно розшифровано scPTZ.

Зазначені зауваження не мають принципового характеру та не знижують наукової цінності дисертаційної роботи.

Хочу окреслити результати, які викликають науковий інтерес, зокрема в аспекті подальшого поглибленого аналізу закономірностей структура-активність та уточнення можливих механізмів дії синтезованих сполук:

1. стр. 106 результати щодо подібності спектра протисудомної активності сполук 2.14 та 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону (Les-6222). У зв'язку з цим доцільним видається проведення порівняльного аналізу їхньої хімічної структури, фізико-хімічних параметрів, а також зіставлення результатів молекулярного докінгу. Такий підхід дозволив би обґрунтувати можливу структурну детермінованість подібних фармакологічних ефектів та уточнити припущення щодо спільності механізмів дії, зокрема потенційної протизапальної активності.
2. дослідження протисудомної активності виконано з використанням фіксованої тестової дози досліджуваних сполук 100 мг/кг. Водночас визначення повної залежності «доза–ефект» для найбільш активних

похідних та розрахунок показників ED<sub>50</sub> дозволили б більш кількісно оцінити їх фармакологічний потенціал і здійснити коректніше порівняння з референтним препаратом у дозі 300 мг/кг.

Під час аналізу дисертації виникли деякі питання, які варто обговорити під час захисту:

1. У схемі 2.1 синтезу базових тіопірано-тіазольних каркасів проміжний продукт реакції Кньюенагеля не відображений, хоча в тексті описано його утворення внаслідок нуклеофільного приєднання активного метиленового фрагмента 4-тіоксо-2-оксотіазолідинону до карбонільної групи ароматичного альдегіду. Аналогічний механістичний підхід наведено для схеми 2.2, з наступною візуалізацією проміжної сполуки 2.5, що формується циклоконденсацією за механізмом гетеро-Дільса-Альдера. Чи було експериментально підтверджено утворення зазначених проміжних продуктів? Чи здійснювалося їх виділення або спектральна фіксація? Яким чином доводилося “повне перетворення вихідних реагентів на відповідний інтермедіат”?
2. Чим було обґрунтовано вибір саме протисудомної активності як пріоритетного напрямку фармакологічного вивчення синтезованих похідних? За якими структурними, фізико-хімічними або прогнозованими фармакокінетичними параметрами здійснювався відбір сполук для первинного протисудомного скринінгу? Зокрема, якими критеріями керувалися при виборі чотирьох представників серії 2.3 (2.3a, 2.3c, 2.3d, 2.3j) із семи синтезованих сполук?
3. На чому ґрунтується висновок про імітацію дії діазепаму, якщо порівняльний аналіз амінокислотних взаємодій та конформаційного розміщення, як і фармакодинамічні розрахунки відносно флумазенілу не представлений (афінність у 2.14 вища щодо обох лігандів)? І яку мету ви ставили використовуючи як референс позитивний алостеричний модулятором ГАМКА-рецептора (діазепам) та антагоніст бензодіазепінів (флумазеніл). Чи не доцільно було б розглянути альтернативні молекулярні мішені, враховуючи мультитаргетний механізм дії вальпроату, який був використаний як референс?

**Висновок.** За результатами аналізу дисертаційної роботи Гойдика Михайла Володимировича на тему «Синтез та біологічна активність нових хромено[4',3':4,5]тіопірано[2,3-d]тіазолів та їх 3-заміщених похідних», наукових публікацій, в яких висвітлені основні її положення, можна зробити висновок, що за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, практичною значущістю, ступенем обґрунтованості наукових положень та висновків вона відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої



вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженим Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, а її автор, Гойдик Михайло Володимирович, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» галузі знань 22 «Охорона здоров'я».

**Офіційний опонент:**

**професор ЗВО кафедри фармацевтичної хімії  
Національного фармацевтичного університету,  
доктор фармацевтичних наук,  
професор**

**Ганна СЕВЕРІНА**