

## **ВІДГУК**

**офіційного опонента, доктора медичних наук, професора  
СМОЛАНКИ ІВАНА ІВАНОВИЧА**

**на дисертацію**

**КОНОВАЛЕНКА СЕРГІЯ ВОЛОДИМИРОВИЧА**

**на тему**

**«ПОДОЛАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ  
ЗАЛОЗИ ДО ДОКСОРУБІЦИНУ ЗА УМОВ ЛАЗЕРНОГО  
ОПРОМІНЕННЯ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)»,**

**представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 26. 155.005, що  
утворена до рішення вченої ради Інституту експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України від 27.12.2023  
(протокол № 13) та наказу директора Інституту експериментальної  
патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України від  
27.12.2023 № 57-ЗАГ з правом прийняття до розгляду та проведення  
разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі  
знань 22 «Охорона здоров'я» зі спеціальності 222 «Медицина»**

### **Ступінь актуальності обраної теми**

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я рак є другою причиною смерті в усьому світі – майже 10 мільйонів смертей у 2020 році. Найпоширенішим різновидом раку за кількістю нових випадків захворювання є рак молочної залози (РМЗ) - 2,26 млн випадків щороку (WHO, Cancer-2022), тому РМЗ – найактуальніша медико-соціальна проблема.

В даний час сформовані сучасні уявлення про молекулярно-генетичну природу злоякісного росту та продовжуються клінічні та експериментальні дослідження з метою підвищення ефективності лікування цього захворювання.

Одним з основних завдань розробки нових підходів до лікування є подолання резистентності клітин РМЗ до хіміотерапії, яка є однією з ключових проблем сучасної онкології.

Перспективним напрямом подолання резистентності пухлин до хіміотерапевтичних впливів є приєднання до лікувальних протоколів додаткових протипухлинних чинників: використання ліпосомальних носіїв етіотропних препаратів, наночастинок, електромагнітного та лазерного опромінення.

Однак слід зазначити, що на сьогодні не досліджено ефектів застосування лазерного опромінення як ад'юванта основних хіміотерапевтичних препаратів в лікуванні РМЗ, зокрема доксорубіцину, з метою подолання резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії.

Враховуючи вищевикладене, актуальність теми дисертаційного дослідження Коноваленка Сергія Володимировича, яке присвячено подоланню резистентності клітин раку молочної залози до доксорубіцину за умов лазерного опромінення, не викликає сумнівів як у теоретичному так і в практичному аспектах.

### **Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача**

Робота виконана у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії ІЕПОР імені Р.Є. Кавецького НАН України. В роботі були використані сучасні валідовані методи досліджень та аналізу даних. Отримані дані пройшли належну обробку з використанням методів математичного статистичного аналізу; отримані обґрунтовані результати та зроблені висновки, які логічно впливають з результатів дослідження та відповідають меті та завданням роботи.

Дисертаційне дослідження висвітлює ряд аспектів резистентності клітин раку молочної залози до доксорубіцину, а також розкрило критичну важливість проходження пухлинними клітинами апоптотичного порогу завдяки поєднанню цитотоксичної дії хіміопрепарату та інфрачервоного лазерного опромінення.

Отримані в ході досліджень результати оприлюднено у 12 наукових працях, зокрема у 8 статтях у фахових журналах, 3 з яких у закордонних виданнях з індексацією у наукометричній базі Web of Science, та 4 тез у збірках наукових праць вітчизняних і міжнародних конференцій.

Дисертаційна робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи відділу моніторингу пухлинного процесу і дизайну терапії ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2019-2023 рр., № держреєстрації 0118U005468 ) та «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U002034).

**Новизна представлених теоретичних та/або експериментальних результатів проведених здобувачем досліджень, повнота викладу в опублікованих працях.**

Ціла низка результатів і висновків, які з них слідують, були отримані вперше і мають високий ступінь наукової новизни. Автором вперше показана можливість застосування неущкоджуючого низькоенергетичного лазерного випромінювання для модуляції чутливості клітин РМЗ до хіміотерапевтичного препарату доксорубіцину.

Автором доповнено наукові дані щодо стимуляції лазерами низької енергії апоптотичної програми у чутливих та резистентних до доксорубіцину пухлинних клітин, що підтверджено даними експресії маркерів апоптозу p53 та Вах. Поєднаний вплив інфрачервоного лазерного випромінювання і доксорубіцину у відносно малій концентрації 0,5 мкг/мл призвів до підвищення експресії Вах та p53 до рівня  $70,1 \pm 3,6$  балів H-Score та  $77,2 \pm 5,2$  балів H-Score відповідно, що вдвічі перевищує показники в групі контролю. Вперше вивчено особливості поєднаного впливу лазерного опромінення і доксорубіцину на розподіл клітин РМЗ людини за фазами клітинного циклу – доведена антипроліферативна

ефективність запропонованої методики: зафіксовано найменшу кількість клітин у фазі G2/M (24,44%) на тлі високої частки клітин у фазі G0/G1 – 43,4% ( $p < 0,05$ ).

Автором уперше охарактеризовано цитоморфологічні зміни клітин РМЗ у відповідь на поєднане застосування доксорубіцину і лазерного опромінення: розрив наростання суцільного шару клітин, розрив мембран та фрагментація цитоплазми, появу виражених дистрофічних змін, гігантських клітин з гіперхромними ядрами.

Автором вперше запропоновано інтегральну схему подолання апоптотичного порогу пухлинною клітиною, яка зазнала впливу доксорубіцину та інфрачервоного лазерного випромінювання при певних умовах: термін дії лазера 7 та 10 хвилин, доза опромінення 15 Дж/см<sup>2</sup>, щільність потужності 50мВ/ см<sup>2</sup>, довжина хвилі 810 нм.

Результати роботи опубліковані в реферованих журналах, а також були представлені у вигляді доповідей на фахових наукових конференціях в Україні та США. Публікації повністю перекривають і вирішують завдання, що були поставлені в дисертаційному дослідженні. При розгляді матеріалів наукової роботи здобувача встановлено, що текст дисертації Коноваленка Сергія Володимировича є оригінальним: всі власні отримані дані вірно описані та узагальнені, цитовані матеріали мають посилання на відповідне джерело, що міститься в списку використаних робіт. Отже, дисертаційну роботу слід визнати самостійною науковою працею. Таким чином, дисертаційне дослідження Коноваленка Сергія Володимировича виконане на високому науково-методичному і методологічному рівнях. Результати і положення дисертації, які виносяться на захист, відповідають всім вимогам положення на здобуття наукового ступеню доктора філософії, є обґрунтованими та логічними, мають високий ступінь наукової новизни та практичне значення.

**Наукова обґрунтованість отриманих результатів, наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації**

Обґрунтованість результатів дослідження, положень та висновків досліджень дисертаційної роботи Коноваленка Сергія Володимировича не викликають жодних зауважень. Експериментальне дослідження виконано на клітинних лініях аденокарциноми молочної залози людини MCF-7 та MCF-7/DOX, які були поділені на відповідні групи згідно логіки наукового дослідження та відповідно до сучасних поглядів біоетики щодо експериментальних досліджень. Отримані дані були оброблені адекватними математичними методами і був проведений їх статистичний аналіз, висновки дисертаційної роботи логічно витікають із отриманих результатів.

Комісія з питань етики ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України щодо дотримання етичних принципів при виконанні дисертаційного дослідження Коноваленка Сергія Володимировича позитивно оцінила дисертаційне дослідження «Подолання резистентності клітин раку молочної залози до доксорубіцину за умов лазерного опромінення (експериментальне дослідження)» (протокол №5 від 17.11.2022 р.).

### **Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності**

В ході дисертаційної роботи проведена експозиція клітин аденокарциноми молочної залози людини культур MCF-7 та MCF-7/DOX з різними дозами доксорубіцину та опромінення з використанням червоного та інфрачервоного лазера. Здобувачем проведений аналіз біологічної активності пухлинних клітин з оцінкою проліферативного потенціалу, експресії маркерів апоптозу, особливостей розподілу клітин за фазами клітинного циклу, а також – детальний опис цитоморфологічних характеристик після застосування хіміопрепарату та лазерного опромінення низької енергії. Здобувачем виконана статистична обробка отриманих даних. Поставлені наукові завдання реалізовано на високому методологічному рівні, а дисертант оволодів необхідними для рівня доктора філософії компетенціями.

### **Теоретичне і практичне значення результатів дослідження**

Результати і висновки проведеного дослідження суттєво доповнюють існуючий рівень знань про вплив інфрачервоного лазерного опромінення на виживаність та біологічну поведінку клітин РМЗ людини. Здобувачем встановлені механізми подолання апоптотичного порогу пухлинними клітинами, яке відбувається завдяки синергічному впливу цитотоксичної протипухлинної дії доксорубіцину і модулюючих ефектів лазерного випромінювання, яке провокує ініціацію каскадів реакцій за участю активних форм кисню (АФК), у тому числі і АФК-індукованого синтезу АФК.

Результати досліджень використовуються в лекційних курсах і на семінарах інституту біології і медицини НУ імені Т.Г.Шевченка, а також на лекціях і практичних заняттях аспірантів 1 року навчання ІЕПОР імені Р.С.Кавецького НАН України.

### **Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому**

Дисертаційна робота Коноваленка Сергія Володимировича викладена українською мовою на 141 сторінці. Структура роботи відповідає вимогам МОН України та положенню про присудження ступеня доктора філософії. Вона структурована і складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу з отриманими результатами власних досліджень та їх обговоренням, розділу аналізу і узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатку. Результати дослідження ілюстровані за допомогою 33 рисунків і 24 таблиць. Список цитованої літератури охоплює 181 найменування.

**Анотація** у стислій формі представляє основні тези дисертаційного дослідження, наводить перелік публікацій, в яких викладені основні результати представленої дослідження. Анотація викладена українською і англійською мовами.

У **вступі** визначено об'єкт і предмет дослідження, наведено актуальність обраної теми, зазначені особисті внески дисертанта та інформацію про

апробацію дисертації на профільних заходах. Вступ дисертаційної роботи презентує актуальність, мету та завдання, а також об'єкт, предмет і методи досліджень, які мають відповідну структуру та зміст. Вступ містить інформацію про наукову новизну та практичне значення виконаної роботи і про можливості практичного застосування результатів проведених досліджень.

**У розділі «Огляд літератури»** представлено аналіз даних, які стосуються сучасного стану уявлень про дію лазерного випромінювання на пухлинні клітини, зокрема клітини РМЗ. Також висвітлено питання дії лазерів на імунокомпетентні клітини. Окрема увага приділена протипухлинній дії DOX, його токсичним властивостям, фотомодуляції власне молекули DOX, підкреслюється важлива роль цитохром-С-оксидази, АФК та механізми АФК-індукованого вивільнення АФК у пухлинних клітинах під впливом поглинутого фотону. З огляду на зростання активності проапоптотичних регуляторів це робить перспективним поєднане застосування DOX з лазерним опроміненням. Кінцевою метою такого підходу є ослаблення системного токсичного впливу хіміопрепарату за рахунок зменшення його дозування – зі збереженням рівня цитотоксичної дії на пухлинні клітини.

**Розділ «Матеріал і методи дослідження»** містить опис методів, матеріалів та обладнання, які були використанні в ході виконання роботи. Серед них методика культивування досліджуваних клітин ліній MCF-7 та MCF-7/DOX, імуноцитохімічний (ІЦХ) метод визначення експресії маркерів проліферації та апоптозу з використанням відповідних моноклональних антитіл, методика лазерного опромінення пухлинних клітин, оцінка впливу на розподіл клітин за фазами клітинного циклу, опис цитоморфологічних досліджень, а також – подальшої статистичної обробки отриманих даних. Використані методи повною мірою відповідають сформульованій меті та завданням дисертаційної роботи.

**Розділ «Результати та обговорення»** охоплює великий пул даних, отриманих дисертантом у власних дослідженнях. В першу чергу вони стосуються визначення доз лазерного опромінення культури клітин РМЗ та підбору його оптимальних режимів в поєднанні з ХТ стосовно обох клітинних

ліній, як чутливої до дії DOX, так і резистентної; важливий результат полягає у підборі порядку впливу вказаних чинників на пухлинні клітини. Найбільш ефективним виявилось застосування випромінювання інфрачервоного лазера (810 нм, 15 Дж/см<sup>2</sup>) з експозицією 5-10 хв після інкубації клітин з DOX. Таким чином було досягнуто цитотоксичного ефекту саме у клітинній лінії MCF-7/DOX, резистентній до використаного антибіотика.

Проілюстровані фотографіями, ретельно описані і вивчені цитоморфологічні зміни клітин ліній MCF-7 та MCF-7DOX, викликані впливом DOX і лазерного опромінення окремо і у поєднанні.

Комбіноване застосування DOX і інфрачервоного лазерного випромінювання викликало експресію маркерів апоптозу Вах та p53 і помітне зниження рівня маркера проліферації Ki-67. Це дало підґрунтя для ствердження, що саме поєднаний вплив ХТ і фотобіомодуляції (ФБМ) спонукає пухлинну клітину перейти до стану апоптозу і запрограмованої клітинної смерті. Дисертант особливо зауважує, що надає перевагу саме інфрачервоному лазеру (довжина хвилі 810 нм), незважаючи на певний ефект червоного (660 нм) лазера, тому що інфрачервоне світло лежить далеко від максимуму смуги екстинкції DOX – 450-480 нм. Це робить слушним висновок про синергізм дії інфрачервоного випромінювання і антибіотика, оскільки надійно виключає реалізацію фотодинамічного ефекту тільки через світлове збудження молекули DOX.

За підсумком даних пошукач робить висновок, що комбінація лазерного опромінення низької енергії та хіміопрепаратів незабаром може стати перспективним напрямом в лікуванні онкологічних пацієнтів.

**Розділ «Аналіз та узагальнення результатів досліджень»** містить ретельний огляд світових тенденцій використання лазерного опромінення в онкологічній науці та практиці. Належну увагу приділено творчому доробку ІЕПОР ім Р.Є.Кавецького в галузі лазерної біології і медицини. Саме співробітники ІЕПОР на чолі з доктором біологічних наук, професором М.Ф. Гамалією ще у 70-ті роки минулого століття заклали підґрунтя для використання лазерного випромінювання низької, неущкоджуючої інтенсивності

довгохвильової частини спектру в експериментальній онкології. Ними ж зроблені перші кроки на шляху біостимулювальної лазерної терапії, зокрема з застосуванням внутрішньовенного лазерного опромінення крові. Пошукач вдало перекинув місток від досліджень попередників до результатів власної роботи.

Як один з головних результатів проведених досліджень, дисертант пропонує удосконалену інтегральну схему синергічної дії лазера інфрачервоного спектру і DOX на пухлинну клітину, при застосуванні якої лазер відіграє роль своєрідного ад'юванта ХТ. Послідовне інгібування топоізомерази II під впливом антибіотика з наступною активацією цитохром-С-оксидази, викликаній інфрачервоним світлом, веде до т.зв. АФК-індукованого вивільнення АФК, зниження рівня білка Ki-67 та експресії білків p53 і Bax, що свідчить про гальмування проліферації, апоптотичні зміни в клітині і перехід її в стан запрограмованої клітинної смерті. Повільне збудження DOX під дією інфрачервоного лазера та його пролонгована метаболізація ефективно пригнічує проліферативну активність та створює умови для виходу злоякісно трансформованої клітини в апоптоз шляхом подолання апоптотичного порогу (apoptotic threshold).

Наприкінці проведеної дослідницької роботи кристалізується висновок, що лазерне опромінення інфрачервоного спектру, яке діє як додатковий фактор впливу разом з хіміопрепаратом, модулює каскади біологічних реакцій у резистентних до доксорубіцину клітинах таким чином, що вони стають більш чутливими до цитостатику. Отримані результати відкривають перспективу подолання резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії шляхом приєднання до неї інфрачервоного лазерного опромінення.

**Висновки** дисертаційної роботи в цілому відповідають поставленим у ній меті та завданням. Результати досліджень, наведені у висновках, статистично оброблені й достовірні.

**Список використаних джерел** складається з 181 посилання на реферовані джерела в вітчизняних і міжнародних виданнях, наукові огляди та керівництва. Таким чином, дисертація Коноваленка Сергія Володимировича відповідає існуючим вимогам та є завершеною науковою працею, результати якої

вирішують актуальну наукову задачу сучасної онкології, мають теоретичне і практичне значення.

### **Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці**

Отримані результати дисертаційного дослідження Коноваленка Сергія Володимировича про подолання резистентності клітин раку молочної залози до доксорубіцину за умов лазерного опромінення рекомендовані для використання у діяльності навчальних кафедр медичних навчальних закладів, в науково-дослідницьких розробках наукових установ, дослідниками при написанні статей та монографій, плануванні досліджень по даному напрямку.

### **Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності.**

Згідно з експертним висновком про перевірку на наявність академічного плагіату, затвердженого директором Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України доктором біологічних наук, професором Л.Г. Бучинською від 03.07.2023 року, унікальність даної роботи станом на 03.07.2023 року становить 97,88% і відповідно до «Кодексу академічної доброчесності в ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України» робота допускається до захисту.

### **Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача**

Принципових зауважень щодо оформлення і змісту дисертаційної роботи, а також щодо отриманих результатів немає. В процесі рецензування виявлені наступні зауваження, які не впливають на позитивну оцінку дослідження:

1. В розділі 1 є поодинокі механічні описки і деякі невідповідності сучасним правилам правопису.

2. В розділі 2 надто багато уваги приділено деталізації етапів імуноцитохімічного дослідження.

3. На рис. 3.15. та 3.16 доцільно вказати клітини (позначити стрілками) про які йде мова у описі рисунків.

В порядку наукової дискусії прошу дисертанта відповісти на наступні питання:

1. Чому для серії експериментів були обрані дози доксорубіцину 0,5 та 2,0 мкг/мл?

2. На Вашу думку який ключовий фактор подолання апоптотичного порогу резистентними клітинами РМЗ людини?

3. Чим можна пояснити перерозподіл клітин РМЗ у премітотичні фази клітинного циклу після використання запропонованої методики?

### **Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам**

Дисертаційне дослідження Коноваленка Сергія Володимировича «Подолання резистентності клітин раку молочної залози до доксорубіцину та підвищення його ефективності за умов лазерного опромінення», представлене на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина» є самостійною завершеною науковою працею, що містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами і розв'язують важливу наукову задачу медицини – подолання резистентності клітин РМЗ людини до доксорубіцину завдяки лазерній модуляції їх чутливості до хіміотерапевтичного впливу цитостатика. За методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною результатів, повнотою публікацій матеріалів дослідження, їх апробації на наукових конференціях дисертаційне дослідження відповідає наказу МОН України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» від 12 січня 2017 р. №40 та положенню Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та

скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її автор заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 - «Медицина».

**Офіційний опонент:**

**доктор медичних наук, професор,**

**завідувач науково-дослідного відділу**

**пухлин грудної залози та її реконструктивної хірургії**

**Національного інституту раку МОЗ України**

**Іван СМОЛАНКА**