

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, професора

РУСИНА АНДРІЯ ВАСИЛЬОВИЧА

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

Сучасні статистичні дані свідчать, що онкологічні захворювання є другою причиною смерті після кардіоваскулярної патології. А найбільш розповсюдженим видом раку, зокрема за кількістю нових випадків захворювання, є рак молочної залози (РМЗ). Тому пошук нових терапевтичних підходів для підвищення ефективності лікування РМЗ є актуальним науково-практичним завданням професіоналів медицини по всьому світу. А одним з основних завдань створення нових підходів до лікування є розробка перспективних методик подолання резистентності клітин РМЗ до хіміотерапії,

адже нечутливість пухлин до найбільш розповсюджених хіміотерапевтичних засобів є загально визнаною проблемою сучасної онкологічної науки та практики.

В онкологічних клініках та дослідницьких лабораторіях різних країн продовжується інтенсивний пошук нових актуальних рішень зазначеної проблеми. І одним з напрямів подолання резистентності пухлин до цитостатиків є посилення дії хіміотерапевтичних чинників за рахунок приєднання до них різних додаткових факторів впливу: використання гіпертермії, різних видів опромінення, ліпосомальних носіїв етіотропних препаратів, наночастинок, клітинної терапії, протипухлинних вакцин тощо.

У цьому контексті можна зауважити, що на сучасному етапі не досліджено ефектів та наслідків приєднання до хіміотерапії РМЗ, зокрема до доксорубіцину, лазерного опромінення низької енергії.

Таким чином, тема дисертаційного дослідження Коноваленка Сергія Володимировича, яке присвячено подоланню резистентності клітин РМЗ до доксорубіцину за умов лазерного опромінення, є актуальною з теоретичної та практичної точок зору.

Оцінка наукового рівня дисертації і наукових публікацій здобувача

Дисертаційна робота виконана у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії ІЕПОР імені Р.Є. Кавецького НАН України. У дисертації були використані сучасні методи досліджень та аналізу отриманих даних. Отримані результати оброблені з використанням методів статистичного аналізу; наприкінці роботи сформульовані обґрунтовані висновки, які логічно випливають з результатів дослідження та відповідають меті та завданням роботи. Окрім висвітлення патерну резистентності клітин РМЗ до хіміотерапії, у дисертаційній роботі підкреслено значущість сприяння лазерного опромінення виходу пухлинної клітини у апоптоз шляхом підсилення цитотоксичної дії доксорубіцину, що підтверджено оцінкою експресії відповідних маркерів.

Отримані під час виконання дисертаційної роботи 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 виконувалася в рамках плану науково-дослідних робіт 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.

Наукова новизна отриманих результатів і висновків, які були отримані вперше, не викликають сумнівів. Результати досліджень опубліковані у вітчизняних та зарубіжних періодичних виданнях, а також були представлені у вигляді доповідей на фахових наукових конференціях в Україні та США. Публікації представляють обґрунтовані рішення наукових завдань дисертаційної роботи.

Автор суттєво розширює сучасні наукові уявлення про спектр застосування лазерного випромінювання з метою протипухлинного впливу та доповнює наукові дані щодо стимуляції лазерами низької енергії апоптотичної програми в клітинах аденокарциноми молочної залози.

Автор вперше показав, що поєднаний вплив інфрачервоного лазерного випромінювання і доксорубіцину здатний модулювати експресію цикліну, який залучений у процеси регуляції клітинного циклу. Найбільш помітне зменшення експресії цикліну D1, спостерігалось після застосування доксорубіцину у поєднанні з лазерним опроміненням: до $37,2 \pm 2,12$ %, що в середньому на 27,48 % менше ніж у контролі. Зменшення рівня експресії цього маркера саме у групі «810 + DOX» дозволив стверджувати, що інфрачервоний лазер діє з хіміотерапевтичним агентом у синергії.

Дослідником вперше встановлено, що коли у групах резистентних клітин доксорубіцин був поєднаний із інфрачервоним лазерним опроміненням, відмічалось зростання експресії p21: до $141,2 \pm 4,14$ балів H-Score. Цей результат представляється важливим, адже показник експресії у групі «810+ DOX» на 32,75 % вищий за такий у групі «DOX» та на 76,5 % вищий ніж у групі контролю.

Автором уперше охарактеризовано цитоморфологічні зміни клітин PM3 у відповідь на поєднане застосування доксорубіцину і лазерного опромінення: розрив наростання суцільного шару клітин, утворення ніш та симпластів, появу виражених дистрофічних змін, гігантських клітин з великими ядрами.

Автором вперше запропоновано інтегральну схему подолання апоптотичного порогу пухлинною клітиною, яка зазнала дії інфрачервоного лазерного випромінювання та хіміотерапевтичного впливу.

Дисертаційну роботу Коноваленка Сергія Володимировича слід визнати самостійною науковою працею, оскільки текст дисертації є оригінальним: всі матеріали що цитуються правильно і коректно позначені та відображені в списку літератури, всі текстові співпадиння мають відповідні посилання на першоджерело, яке міститься в списку використаних робіт.

Таким чином вважаю за необхідне визнати, що дисертаційне дослідження Коноваленка Сергія Володимировича виконане на високому науково-методичному і методологічному рівнях, має високий ступінь наукової новизни та практичне значення. Результати і положення дисертації, які виносяться на

захист, є обґрунтованими та логічними, відповідають всім вимогам положення на здобуття наукового ступеню доктора філософії.

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

Обґрунтованість результатів дослідження, формулювання положень та логіка висновків досліджень дисертаційної роботи Коноваленка Сергія Володимировича не викликають 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 сучасними методами статистики. Висновки дисертаційної роботи ретельно обґрунтовані та 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 лазерного випромінювання. 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 лазерів. 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 розширюють сучасні уявлення про вплив лазерного опромінення на виживаність та біологічну поведінку клітин аденокарциноми грудної залози людини. У роботі здобувач вперше акцентує увагу на важливому процесі – подоланні апоптотичного порогу, механізм якого полягає у синергічному впливі цитотоксичної протипухлинної дії доксорубіцину і модулюючих ефектів лазерного випромінювання, яке змінює окисно-відновлювальну рівновагу в клітинах.

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.Є.Кавецького НАН України.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Структура роботи Коноваленка Сергія Володимировича 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, дисертаційна робота викладена українською мовою на 141 сторінці. Список цитованої літератури охоплює 181 найменування.

Анотація дисертаційної роботи викладена українською і англійською мовами та у стислій формі представляє основні тези проведеного дослідження, наводить перелік публікацій, в яких викладені основні результати.

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 вступі визначено об'єкт і предмет дослідження, наведено актуальність вибраної теми, зазначені особисті внески дисертанта та інформацію про апробацію дисертації на профільних заходах.

У розділі «Огляд літератури» представлено сучасне бачення механізмів та аналіз ефективності дії лазерного випромінювання різної довжини хвилі на пухлинні клітинні лінії, зокрема клітини РМЗ. Окрему увагу дисертант приділив особливостям цитотоксичних ефектів доксорубіцину, а також можливому впливу фотобіомодуляції на молекулу цього антрациклінового антибіотика. В огляді окреслено значення окисно-відновних процесів у пухлинних клітинах, роль цитохром-С-оксидази та активних форм кисню (АФК). Ініціація механізмів АФК-індукованого вивільнення АФК у пухлинних клітинах під впливом лазерного випромінювання та подолання апоптотичного порогу – у фокусі уваги дослідника. Модуляція чутливості резистентних до доксорубіцину клітин з використанням інфрачервоного лазера – крок, який надає перспективи розвитку окремого науково-практичного напрямку поєднаного застосування DOX і лазерного опромінення.

Розділ «Матеріал і методи дослідження» містить опис методів, матеріалів та обладнання, які були використані в ході виконання роботи: методики культивування досліджуваних клітин РМЗ людини, імуноцитохімічного методу визначення експресії маркерів проліферації та апоптозу з використанням моноклональних антитіл (МкАТ), методики лазерного опромінення пухлинних клітин, оцінки впливу лазерного опромінення на розподіл клітин за фазами клітинного циклу, опису цитоморфологічних досліджень та статистичної

обробки отриманих даних. Використані методи повною мірою відповідають сформульованій меті та завданням дисертаційної роботи.

Розділ «Результати та обговорення» охоплює великий масив отриманих у дослідженнях даних. На початковому етапі увагу приділено визначенню доз лазерного опромінення культури клітин РМЗ та підбору його оптимальних режимів в поєднанні з доксорубіцином. Визначний результат серії експериментів – це досягнення цитотоксичного ефекту саме у клітинній лінії MCF-7/DOX, резистентній до використаного антибіотика. Найбільш ефективним виявилось застосування випромінювання інфрачервоного лазера (810 нм, 15 Дж/см²) з експозицією 5-10 хв після інкубації клітин з DOX.

Важливо, що цитоморфологічні зміни клітин ліній MCF-7 та MCF-7/DOX, викликані впливом DOX і лазерного опромінення окремо і у поєднанні, проілюстровано мікрофотографіями, які ретельно описані.

У дисертаційній роботі вперше встановлено, що комбіноване застосування DOX і інфрачервоного лазерного випромінювання викликало підвищення експресії маркерів апоптозу Вах та р53 і зниження експресії маркера проліферації Ki-67. Такі результати надали можливість авторові роботи стверджувати, що саме поєднаний вплив ХТ і фотобіомодуляції (ФБМ) спонукає пухлинну клітину розпочати перехід до апоптозу. Модуючий вплив інфрачервоного лазерного опромінення низької енергії, довжина хвилі якого (810 нм) зсунута вправо від піку екстинкції DOX (450-480 нм), реалізується шляхом пролонгації вивільнення основного метаболіту доксорубіцину – доксорубіцинолу. На думку автора роботи, інфрачервоний лазер створює умови для подолання клітиною апоптотичного порогу, що підтверджено аналізом експресії відповідних маркерів. Насамкінець кристалізується висновок, що існує певний синергізм дії інфрачервоного випромінювання і антибіотика, що призводить до критичних і незворотних змін у пухлинних клітинах.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» містить огляд сучасних світових тенденцій використання лазерного опромінення в онкології та окремі акценти на невирішених питаннях у цій галузі. Слід віддати авторові

належне, що він з вдячністю та повагою згадує про досягнення співробітників ІЕПОР ім Р.Є.Кавецького у дослідницькому напрямі лазерної біології і медицини, зокрема доктора біологічних наук, професора М.Ф. Гамалєї. Базуючись на сучасних уявленнях про дію лазерів на пухлинні клітини та спираючись на дані своїх попередників, дисертант запропонував удосконалену інтегральну схему синергічної дії інфрачервоного лазерного випромінювання і DOX на пухлинну клітину, в результаті якої відбувається ініціація апоптотичного каскаду. Таким чином, у дисертаційній роботі викладено теоретичні основи і після серії експериментальних досліджень обґрунтовано перспективи застосування лазерів низької енергії у якості ад'ювантів хіміотерапевтичного впливу на резистентні до DOX клітини РМЗ.

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. 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 подальших досліджень в даній галузі.

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 рисунок 1.1 представлений з підписами англійською мовою, доцільно їх перекласти українською або у підписі до рисунку навести переклад термінів.
2. В розділі 3, глава 3.1 дуже детально описаний підбір доз опромінення пухлинних клітин, можна опис дещо скоротити, але без шкоди для цілісності та логіки викладення матеріалу.
3. У розділі 3, рисунки 3.5. та 3.6 доцільно збільшити на 10-15% , щоб краще було видно цитоморфологічні особливості пухлинних клітин.

В порядку наукової дискусії прошу дисертанта відповісти на наступні питання:

1. Чому дизайн експериментів включав лазерне опромінення пухлинних клітин після додавання до них доксорубіцину?
2. На Вашу думку, в чому полягає головна перевага застосування саме інфрачервоного лазера для подолання резистентності пухлинних клітин РМЗ до доксорубіцину?
3. Як Ви можете оцінити перспективи збільшення доз доксорубіцину та доз опромінення для подолання резистентності пухлинних клітин до хіміотерапії?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Коноваленка Сергія Володимировича «Подолання резистентності клітин раку молочної залози до доксорубіцину за умов лазерного опромінення (експериментальне дослідження)», представлена 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 відповідними результатами і вперше пояснюють механізми подолання резистентності клітин РМЗ людини до доксорубіцину шляхом модуляції їх чутливості до цього цитостатика завдяки використанню лазерного випромінювання. 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 кафедрою онкології УжНУ

Заслужений винахідник України

Директор КНП

«Закарпатський протипухлинний центр» ЗОР

Андрій Русин