ВІДГУК

офіційного опонента, доктора медичних наук, професора

ЧЕШУКА ВАЛЕРІЯ ЄВГЕНОВИЧА

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

Найбільш розповсюдженим онкологічним захворюванням серед жіночого населення на сучасному етапі є рак молочної залози (РМЗ). Через всебічний розвиток діагностичних технологій клініцистам вдається у переважній більшості випадків діагностувати РМЗ на ранніх стадіях. Але нажаль, рано чи пізно прогресування захворювання, навіть після вчасного проведення хірургічного лікування та поліхіміотерапії, залишається невідворотним сценарієм для багатьох пацієнток. Тому слід визнати, що пошук нових терапевтичних підходів для підвищення ефективності лікування РМЗ є на сьогодні актуальною задачею. Однією з загальновизнаних медичних проблем

онкології є резистентність пухлин до медикаментозної терапії, тому розробка та вивчення ефективності нових методик подолання резистентності клітин РМЗ до хіміотерапії є актуальним науково-практичним завданням для науковців та клініцистів. У дослідницьких установах та онкологічних центрах світу триває активний пошук нових рішень зазначеної проблеми.

Одним з напрямів подолання резистентності пухлин до хіміотерапевтичних препаратів є поєднання хіміотерапії з додатковими факторами протипухлинного впливу, серед яких застосування різних видів опромінення, наночастинок та інших таргетних носіїв, гіпо- та гіпертермії, імунотерапевтичних засобів. На тлі всебічного розвитку фотодинамічної терапії пухлин з використанням фотосенсибілізаторів, поки що не дослідженими залишаються механізми протипухлинної дії фотобіомодуляції, що передбачає вплив на пухлину лазерним опроміненням з більшою довжиною хвилі і яка б могла створювати умови для подолання резистентності пухлинних клітин до найбільш розповсюджених цитостатиків, зокрема доксорубіцину.

Отже, дисертаційна робота Коноваленка Сергія Володимировича, яка присвячена подоланню резистентності клітин РМЗ до доксорубіцину за умов лазерного опромінення, є на сучасному етапі актуальним і затребуваним експериментальним дослідженням.

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. Сформульовані на основі результатів висновки логічно випливають з отриманих даних та повністю відповідають меті і завданням експериментального дослідження. Для подолання резистентності клітин РМЗ до хіміотерапії дисертант обгрунтовано пропонує зосередитись на створенні умов для ініціації реакцій апоптозу за умов лазерного опромінення. В роботі вивчено та висвітлено вплив червоного та інфрачервоного лазерів на експресію

біологічних маркерів апоптозу і підтверджено синергічну протипухлинну дію фотобіомодуляції та доксорубіцину. Лазерне випромінювання забезпечило подолання клітинами РМЗ апоптотичного порогу за рахунок зростання показників експресії проапоптотичних і зниження протиапоптотичних молекул-регуляторів.

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.

Наукова новизна отриманих результатів не викликає сумнівів. Опубліковані в ході виконання дисертаційної роботи наукові статті, які презентують результати різних етапів екпериментального дослідження, значно розширили сучасні наукові уявлення про взаємодію енергії лазерного випромінювання з пухлинними клітинами і розкрили нові можливості подолання резистентності клітин РМЗ до доксорубіцину. Публікації представляють рішення наукових завдань дисертаційної роботи та стали основою для контенту наукових доповідей здобувача на фахових наукових конференціях в Україні та за кордоном.

В ході виконання дисертаційної роботи автором вперше розкриті нові можливості застосування інфрачервоного лазерного випромінювання для модуляції чутливості клітин РМЗ до доксорубіцину.

Автором вперше доведено можливість модуляції проліферативного потенцалу клітин РМЗ з використанням лазерного випромінювання низької енергії. У резистентній до доксорубіцину клітинній лінії MCF-7/DOX вплив поєднаної дії лазерного опромінення різних режимів та різних доз DOX призвів до зменшення проліферативного потенціалу. Слід зазначити, що вплив саме інфрачервоного світла (λ810 нм) у поєднанні з хіміотерапевтичним чинником у дозі 2,0 мкг/мл викликав пригнічення експресії Ki-67 до рівня 175,2±5,1 балів H-Score, що на 33 % менше за показник у групі контролю. Крім того, тенденція до зниження експресії Ki-67 у клітинах MCF-7DOX після застосування меншої дози цитостатика (0,5 мкг/мл) та інфрачервоного лазера свідчить про синергічну дію фотобіомодуляції та доксорубіцину. Вперше вивчено особливості поєднаного впливу лазерного опромінення і доксорубіцину на розподіл клітин РМЗ людини за фазами клітинного циклу – доведена антипроліферативна ефективність запропогнованої 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 вперше запропоновано інтегральну схему подолання апоптотичного порогу пухлинною клітиною, яка зазнала впливу доксорубіцину та інфрачервоного лазерного випромінювання.

Дисертаційну роботу Коноваленка Сергія Володимировича слід визнати самостійною науковою працею: текст дисертації є оригінальним, матеріали, що цитуються коректно позначені та відображені в списку літератури.

Таким чином, на мою думку, дисертаційна робота Коноваленка Сергія Володимировича виконана на належному науково-методичному і методологічному рівні; матеріали дисертації, які виносяться на захист, є обґрунтованими і відповідають вимогам положення на здобуття наукового ступеню доктора філософії.

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

Представлення результатів, їх обгрунтованість та формулювання висновків у дисертаційній роботі не викликають зауважень. Експериментальне дослідження виконано на клітинних лініях РМЗ людини «MCF-7» та «MCF-7DOX», що були розподілені на відповідні групи з урахуванням вимог з точки зору наукових та біоетичних аспектів. Отримані дані були оброблені сучасними методами статистики, а висновки ретельно обгрунтовані.

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

Здобувачем проведений аналіз біологічної активності пухлинних клітин культур «MCF-7» та «MCF-7DOX» з оцінкою проліферативного потенціалу, експресії маркерів апоптозу, особливостей розподілу клітин за фазами клітинного циклу, а також – детальний опис цитоморфологічних характеристик після застосування доксорубіцину у поєднаннні з червоним та інфрачервоним лазерним випромінюванням. Після отримання даних проведена їх статистична обробка. Впродовж виконання експериментального дослідження дисертант оволодів необхідними для рівня доктора філософії науковими знаннями, компетенціями та практичними навичками; поставлені наукові завдання реалізовано на належному методологічному рівні.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Результати і висновки проведеного дослідження суттєво розширюють сучасні уявлення про вплив лазерного опромінення на виживаність та біологічну поведінку чутливих та резистентних до доксорубіцину клітин РМЗ людини. У дисертаційній роботі пошукач вперше висвітлює ключовий процес, який відбувається внаслідок поєднаної дії доксорубіцину і лазерного випромінювання і внаслідок якого пухлинна клітина починає шлях до запрограмованої загибелі – подолання порогу ініціації апоптозу.

Отриманні в ході експериментального дослідження результати 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

Дисертація 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 експериментальної роботи проілюстровані за допомогою 33 рисунків і 24 таблиць, дисертаційна робота викладена українською мовою на 141 сторінці, список літератури складається з 181 найменування. Структура дисертації Коноваленка Сергія Володимировича повністю відповідає вимогам МОН України та положенню про присудження ступеня доктора філософії.

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 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. Вступ логічно і обгрунтовано презентує актуальність, мету та завдання, а також об'єкт, предмет і методи досліджень, які мають відповідну структуру та зміст.

У розділі «Огляд літератури» наголошено на актуальності проблеми пошуку ефективних способів подолання резистентних злоякісних клітин до дії протипухлинних препаратів, зокрема широко застосованого антибіотику антрациклінового ряду – доксорубіцину. В огляді розглянуто сучасні з'ясовані механізми впливу лазерного випромінювання на пухлинні клітинні лінії. Важливим підрозділом огляду літератури є опис відомих цитотоксичних ефектів доксорубіцину, а також перспективи застосування лазерного опромінення для модуляції цитотоксичної активності препарату. В огляді вперше сформульоване обгрунтоване припущення, що відомі на сьогодні протипухлинні ефекти доксорубіцину, які зокрема включать порушення окисно-відновної рівноваги на мітохондріях пухлинних клітин, можуть бути посилені за рахунок приєднання до хіміопрепарату фотобіомодулюючого впливу інфрачервоного лазерного випромінювання. Модуляція чутливості резистентних до хіміотерапії клітин РМЗ людини клітин за допомогою лазерного випромінювання низької енергії з довжиною хвилі 810 нм розглядається автором роботи як перспективна, але досі не вивчена і не описана методика підвищення ефективності протипухлинних засобів.

У розділі «Матеріали і методи дослідження» наведено опис методів, матеріалів та обладнання, які були використанні в ході виконання експериментального дослідження: методики культивування клітинних ліній MCF-7 та MCF-7DOX, методики лазерного опромінення пухлинних клітин, імуноцитохімічного методу, проточної цитофлоуметрії та статистичної обробки даних. Використані методи відповідають меті та завданням дисертаційної роботи.

Розділ «Результати та обговорення» представляє дані, отримані в ході серії експериментів. У підрозділах цієї частини дисертаційної роботи спершу детально описаний підбір доз доксорубіцину та доз і термінів лазерного опромінення для клітинних ліній РМЗ. Отримавши оптимальні для дослідження параметри опромінення та дози цитостатика, дисертант у основній частині експериментального дослідження детально вивчає та ретельно описує вплив поєднаного застосування лазерів та хіміопрепарату на виживаність та біологічну поведінку пухлинних клітин. Отримані в серії експериментів наукові дані вперше розкривають багатообіцяючий потенціал застосування лазерного випромінювання у якості модулюючого фактору, що впливає на ефективність доксорубіцину шляхом підвищення рівня чутливості до нього клітин РМЗ людини. Результати роботи показали, що комбіноване застосування DOX і інфрачервоного лазерного випромінювання викликало подолання пухлинними клітинами апоптотичного порогу: відбувалося підвищення експресії маркерів апоптозу Bax та p53 і зниження експресії Bcl-2. Також, вперше описаний модулюючий ефект лазерного опромінення на антипроліферативну ефективність доксорубіцину – встановлено здатність інфрачервоного лазера сприяти перерозподілу клітин у премітотичні фази клітинного циклу, сприяти підвищенню рівня експресії p21 та зниженню рівня експресії цикліну. Більш того, автором роботи вперше ретельно описані цитоморфологічні зміни пухлинних клітин, які відбулися внаслідок поєднання різних доз доксорубіцину і різних режимів лазерного опромінення.

Таким чином, розділ містить великий масив даних, які представлені логічно і послідовно, а також, там де це необхідно – проілюстровані за допомогою таблиць, діаграм та мікрофотографій.

В розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» на самому початку пошукач розкриває основні принципи застосування лазерних технологій в онкології, а згодом акцентує увагу на перспективах приєднання до дії цитостатиків лазерного випромінення як додаткового модулюючого фактору їх протипухлинної ефективності. В розділі логічно і послідовно підбито підсумки серії дослідів, в результаті яких вперше встановлено здатність лазерів

ініціювати такі зміни у клітинах РМЗ ліній «MCF-7» та «MCF-7DOX», які призводять до підвищення їх чутливості до цитотоксичної дії доксорубіцину. Внаслідок модулюючого впливу лазерного опромінення у клітинах виникають умови, за яких вони долають апоптотичний поріг, демонструють зниження проліферативного потенціалу, а також характерні для цитотоксичного впливу морфологічні зміни. Синергічну дію доксорубіцину та інфрачервоного лазерного випромінювання дисертант представив у вигляді удосконаленої інтегральної схеми, яка наочно пояснює механізми ініціації сценарію запрограмованої загибелі у клітинах РМЗ. У дисертаційній роботі викладено теоретичні основи і після серії експериментальних досліджень обгрунтовано перспективи застосування лазерного випромінювання для підвищення протипухлинної ефективності доксорубіцину.

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 переліку умовних позначень відсутні деякі скорочення (наприклад ATL-4).

2. Зустрічаються рисунки які містять англомовні позначення (1.1).

3. У розділі 3 детально описані цитоморфологічні зміни у пухлинних клітинах, які часто повторюються.

В порядку наукової дискусії прошу дисертанта відповісти на наступні питання:

1. Чому для вивчення механізмів подолання резистентності був обраний антрациклінoвий антибіотик доксорубіцин? Останнім часом є тенденції до безантрациклінової хіміотерапії.

2. У дисертаційній роботі відчувається Ваше бажання більше приділяти увагу результатам застосування інфрачервоного лазеру з довжиною хвилі 810 нм, чим це можна пояснити?

3. Як практично в клініці користуватися вашими рекомендаціями? Як здійснювати лазерне опромінення пухлинних клітин на фоні хіміотерапії, наприклад раку грудної залози.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертація 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 обгрунтовані відповідними результатами і вперше пояснюють механізми подолання резистентності клітинних ліній РМЗ до доксорубіцину за допомогою лазерної модуляції. За методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною отриманих даних, повнотою публікацій матеріалів дослідження, рівнем їх презентації на науково-практичних конференціях дисертаційна робота 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,

професор кафедри онкології НМУ ім.О.О.Богомольця,

професор ННЦНПО Інституту післядипломної освіти

НМУ ім.О.О.Богомольця Валерій Чешук