

РЕЦЕНЗІЯ
офіційного рецензента,
на дисертаційну роботу
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

На сьогоднішній день одним з найбільш поширених методів лікування онкологічних хворих залишається хіміотерапія. Незважаючи на значні досягнення і велику кількість досліджень в цій галузі за останні десятиріччя, існує ряд не до кінця вирішених проблем, найбільш значущими з яких є природна та набута резистентність клітин злоякісних новоутворень до хіміопрепаратів. У механізмах резистентності, у тому числі множинної резистентності до медикаментозних засобів, задіяні сигнальні механізми, які пов'язані зі зменшенням накопичення препаратів у злоякісних клітинах, з посиленням видалення його з клітин, активацією систем детоксикації та механізмами відновлення пошкодженої ДНК, ухиленням клітин від апоптозу, індукованого протипухлинними препаратами. В зв'язку з цим не викликає сумнівів актуальність дисертаційної роботи Коноваленка Сергія Володимировича, яка присвячена проблемі підвищення чутливості злоякісно трансформованих клітин до доксорубіцину та подоланню медикаментозної резистентності до цього цитостатику за рахунок підвищення вибіркової дії шляхом використання лазерного опромінення.

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. Усі головні наукові положення дисертації базуються на фактичних даних, є науково та об'єктивно обґрунтованими, чітко сформульованими, містять нові важливі наукові узагальнення та являються логічним підсумком проведених досліджень.

Застосовані в дисертації методи дослідження відповідають поставленим завданням, є сучасними і високоінформативними. Достовірність та обґрунтованість наукових положень, викладених у дисертації, забезпечена достатньою кількістю повторів експериментів і застосуванням коректних методів статистичного аналізу отриманих результатів. Висновки дисертаційної роботи сформульовані чітко, зрозуміло, у відповідності до поставлених задач і повністю відображають отримані результати.

Отримані в ході досліджень результати викладено 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 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.

Автором вперше на моделях клітин раку молочної залози (PM3) людини з різною чутливістю до доксорубіцину експериментально обґрунтовано

ефективність застосування червоного та інфрачервоного лазерного випромінювання для підвищення вибіркової дії цитостатику.

Вперше в системі *in vitro* досліджено механізми впливу інфрачервоного лазерного випромінювання і доксорубіцину на чутливі та резистентні до цитостатику клітини лінії MCF-7. Встановлено, що в механізмах реалізації апоптичної програми під впливом поєднаної дії інфрачервоного лазерного випромінювання і доксорубіцину на клітини з фенотипом медикаментозної резистентності суттєву роль відіграють порушення експресії білків-регуляторів клітинного циклу.

Доповнено дані щодо зміни цитоморфологічних характеристик чутливих та резистентних клітин РМЗ людини внаслідок поєднаного застосування доксорубіцину і лазерного випромінювання. Показано, що застосування лазерного випромінювання для модуляції цитотоксичної активності доксорубіцину призводить до більш виражених цитоморфологічних змін в клітинах резистентної лінії, порівняно з клітинами чутливої лінії.

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

Дисертаційна робота Коноваленка Сергія Володимировича є закінченим науковим дослідженням, яке виконано на високому методичному рівні. Сформульовані автором основні наукові положення та висновки обґрунтовані значною кількістю експериментальних досліджень.

Експериментальне дослідження виконано на клітинах ліній аденокарциноми молочної залози людини MCF-7 та MCF-7/DOX. Отримані експериментальні дані оброблені адекватними математичними методами, висновки дисертаційної роботи логічно витікають із отриманих результатів. Особливо слід відзначити значний об'єм і якість цитоморфологічних та молекулярно-генетичних досліджень *in vitro*, проведених дисертантом, з використанням великої кількості інформативних біомаркерів, що дозволило вичерпно та об'єктивно проілюструвати отримані експериментальні дані.

Результати роботи дають чітку уяву про особливості досліджуваних процесів. Детальна систематизація отриманих даних та їх ретельний аналіз дозволили дисертанту одержати факти, які свідчать про їх значимість для онкології і мають як наукове, так і практичне значення. Отже, наукові положення і висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими

Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

Для вирішення поставлених у роботі завдань, дисертантом обрано сучасні та адекватні культуральні, цитоморфологічні, молекулярно-біологічні та математично-статистичні методи дослідження, які відповідають поставленій меті і завданням. Таким чином, сучасний методичний рівень роботи, інформативність використаних методів дослідження та адекватність статистичного аналізу дозволяють вважати, що результати дослідження повністю відповідають поставленій меті та завданням, а висновки є достовірними і науково обґрунтованими.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Отримані дані розширюють існуючі уявлення про механізми дії лазерного випромінювання на клітини РМЗ людини, в тому числі, резистентні до цитостатиків, та вказують на доцільність його використання для підвищення вибірковості дії доксорубіцину.

В експериментальній системі *in vitro*, на основі комплексного аналізу цитоморфологічних та молекулярно-біологічних показників, охарактеризовано механізми поєданого застосування лазерного випромінювання та доксорубіцину на модельній системі РМЗ, що дозволило вперше обґрунтувати нові підходи щодо подолання фенотипу медикаментозної резистентності.

Теоретично-експериментальні результати дисертаційної роботи мають значний науковий інтерес для фундаментальних наукових досліджень та можуть

бути використані у лекційних курсах та семінарських заняттях з онкомамології, студентам біологічних факультетів та медичних університетів.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота Коноваленка Сергія Володимировича викладена українською мовою на 141 сторінці. Робота складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу результатів досліджень та їх обговоренням, розділу аналізу і узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел. 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 представленого дослідження. Анотація викладена українською і англійською мовами.

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 доксорубіцину, його токсичним властивостям, підкреслюється важлива роль цитохром-С-оксидази, активних форм кисню (АФК) та механізми вивільнення АФК у пухлинних клітинах під впливом поглинутого фотону. З огляду на зростання активності проапоптотичних регуляторів це робить перспективним поєднане застосування доксорубіцину з лазерним опроміненням. Кінцевою метою такого підходу є послаблення системного токсичного впливу

хіміопрепарату за рахунок зменшення його дозування – зі збереженням рівня цитотоксичної дії на злоякісно трансформовані клітини.

Розділ «Матеріали і методи дослідження» містить опис методів, матеріалів та обладнання, які були використанні в ході виконання роботи. Серед них методика культивування клітин ліній MCF-7 та MCF-7/DOX, імуноцитохімічний метод визначення експресії маркерів проліферації, апоптозу та клітинного циклу з використанням відповідних моноклональних антитіл, методика лазерного опромінення пухлинних клітин, оцінка впливу на розподіл клітин за фазами клітинного циклу, опис методів цитоморфологічних досліджень, а також – методи статистичної обробки отриманих результатів.

Розділ «Результати та обговорення» вдало проілюстрований мікрофотографіями, графіками та діаграмами. У кожному підрозділі результатів власних досліджень автор наводить власні джерела цитування. В розділі «Результати та обговорення» викладено результати досліджень щодо визначення доз лазерного опромінення обох досліджених клітинних ліній РМЗ та підбору його оптимальних режимів в поєднанні з цитостатиком стосовно обох клітинних ліній. Згідно даних, отриманих автором роботи, найбільш ефективним виявилось застосування випромінювання інфрачервоного лазера (810 нм, 15 Дж/см²) з експозицією 5-10 хв після інкубації клітин з доксорубіцином. Такий підхід дозволив досягти цитотоксичного ефекту саме у клітинах лінії MCF-7/DOX, резистентній до цитостатика.

Дисертант у основній частині експериментального дослідження детально вивчає та ретельно описує вплив поєданого застосування лазерів та хіміопрепарату на виживаність та біологічні властивості клітин РМЗ з різною чутливістю до доксорубіцину. Отримані дані підтверджують здатність лазерного випромінювання до модуляції цитотоксичної активності доксорубіцину та свідчать на перспективність його використання для подолання медикаментозної резистентності.

У наступних підрозділах автор наводить результати, присвячені дослідженню молекулярно-біологічних аспектів та механізмів дії лазерного

випромінювання і доксорубіцину на клітини РМЗ людини з різною чутливістю до цитостатиків: вивчення цитоморфологічних особливостей клітин, дослідження показників експресії білків-регуляторів апоптозу та клітинного циклу, проліферативної активності клітин та особливостей розподілу за фазами клітинного циклу.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» містить огляд сучасних світових тенденцій використання лазерного випромінювання в онкологічній практиці. Дисертант окреслює перспективні наукові напрями на шляху вирішення проблематики резистентності РМЗ до цитостатиків різного механізму дії. Резюмуючи отримані дані, автор робить припущення, що ад'ювантна фотобіомодуляція злоякісно трансформованих клітин після експозиції з доксорубіцином – це можливість не тільки підвищити ефективність хіміотерапевтичного впливу, але й створення умов для зменшення дози доксорубіцину, що може бути передумовою для зниження токсичності хіміотерапії. Важливим результатом узагальнення проведених досліджень є запропонована дисертантом удосконалена інтегральна схема синергічної дії лазера інфрачервоного спектру і доксорубіцину на злоякісно трансформовані клітини, що включає детальний аналіз механізмів.

Висновки, наведені в дисертації, в цілому відповідають поставленим у ній меті та завданням, мають зв'язок з результатами дослідження.

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 експериментальної онкології.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці

Отримані результати дисертаційного дослідження Коноваленка Сергія Володимировича щодо подолання резистентності клітин РМЗ до доксорубіцину

за умов лазерного опромінення рекомендовані для використання у діяльності кафедр навчальних закладів медичного та біологічного профілю, а також у науково-дослідній діяльності.

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.

Під час рецензування дисертації виникли деякі зауваження щодо її оформлення, які не мають принципового характеру та не зменшують її цінність, а спрямовані тільки на її доповнення та вдосконалення.

Зауваження:

1. У тексті дисертації зустрічаються невдалі вислови та стилістичні вирази.
2. В огляді літератури бажано було б приділити більше уваги розгляду питань щодо механізмів медикаментозної резистентності РМЗ.
3. При висвітленні даних підбору режимів опромінення у розділі 3 деякі таблиці можна логічно об'єднати.
4. У розділі 3 результати дослідження цитоморфологічних особливостей клітин РМЗ надто детально викладені і потребують скорочення. Крім того, ці результати бажано було б розглянути у порівняльному аспекті (чутливі та резистентні клітини). В цьому розділі а також зустрічаються повтори.

5. У заключному розділі дисертації при обговоренні результатів більше уваги бажано було приділити зіставленню отриманих даних щодо механізмів впливу лазерного опромінення та цитостатиків на злоякісно трансформовані клітини з відомостями літератури.

У порядку дискусії бажано почути відповідь на деякі **запитання**:

1. Чому для підвищення цитотоксичної активності доксорубіцину Ви обрали лазери з довжиною хвилі 660 та 810 нм?
2. Який саме комплекс цитоморфологічних ознак у клітинах РМЗ підтверджує ефективність запропонованого Вами підходу до підвищення ефективності доксорубіцину?
3. На Вашу думку механізм синергічної дії лазерного опромінення є універсальним по відношенню до злоякісно трансформованих клітин різного гістогенезу?
4. Чим можна пояснити ідентифіковані зміни експресії білків-регуляторів апоптозу під впливом інфрачервоного лазерного випромінювання, яке не несе безпосередньої пошкоджуючої дії?
5. Чим обумовлені зафіксовані зміни перерозподілу чутливих та резистентних клітин після дії лазерного випромінювання та доксорубіцину?

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 шляхом використання

лазерного опромінення. 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 рецензент:

**Завідувачка лабораторії механізмів
медикаментозної резистентності
Інституту експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України,
старший дослідник, доктор біологічних наук**

Наталія ЛУК'ЯНОВА