

ВІДГУК

офіційного опонента, провідного наукового співробітника науково-клінічного відділу пластичної та реконструктивної онкоурології
ДНП «Національний інститут раку», доктора медичних наук, старшого
дослідника Войленка Олега Анатолійовича, на дисертаційну роботу

Вірича Петра Анатолійовича на тему

«Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок
оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини
(експериментальне дослідження)», подану на здобуття ступеня доктора
філософії з галузі знань 09 «Біологія» зі спеціальності 091 «Біологія»

Атуальність обраної теми досліджень

Відомо, що одне з провідних місць серед існуючих методів лікування онкологічних хворих займає хіміотерапія, яку застосовують як самостійний метод або як компонент комплексного лікування в неoad'ювантному та в ад'ювантному режимах. Водночас, відсутність вибіркової дії відомих цитостатиків, а також висока загальна токсичність обумовлює як подальший пошук нових сполук, так і удосконалення лікарських форм існуючих засобів з метою підвищення їх селективності та безпечності. На сучасному етапі розвитку експериментальної і клінічної онкології значний інтерес зосереджений на використанні наноматеріалів при пухлинному рості. Встановлено, що завдяки своїм властивостям, наночастинок металів та їх оксидів здатні здійснювати міжклітинний та внутрішньоклітинний транспорт протипухлинного препарату, контрольоване вивільнення субстанцій з лікарської форми, доставку лікарського засобу до біомішені. Проте, незважаючи на активні пошуки шляхів оптимізації цитостатичної терапії онкологічних хворих, до цього часу в Україні відсутні стандартизовані протипухлинні нанокомпозити і не досліджені їх біологічні ефекти. Існуючі результати експериментальних досліджень також не дали вичерпних відповідей

на питання щодо механізму їх дії та доцільності застосування для зниження токсикологічних проявів протипухлинних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконана у лабораторії механізмів медикаментозної резистентності ІЕПОР імені Р.Є. Кавецького НАН України, згідно теми «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2019-2023 рр, № держреєстрації 0118U005468) та стипендії Президента України для молодих вчених «Фізико-хімічні властивості та цитотоксична активність наносистем полімер/наночастинка оксиду цинку та доксорубіцину на моделях клітин раку передміхурової залози різного ступеня злоякісності» (2022-2024 рр).

Ступінь обґрунтованості основних положень і висновків, сформульованих у дисертаційній роботі

Достовірність наукових положень та висновків дисертаційної роботи повністю обґрунтовано обраним комплексом методологічних підходів для досягнення поставленої мети та вирішення завдань дослідження. Отримані результати досліджень статистично опрацьовані у використанні пакету програмного забезпечення Statistica 6.0, що дало змогу отримати висновки, один з яких підкреслює перспективність використання наночастинок оксиду цинку в якості цитопротекторів сполук антрациклінового ряду.

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

Наукова новизна отриманих результатів і висновків, не викликають сумнівів. Автором вперше в експериментах *in vivo* доведено переваги застосування Д-ПАА/ZnO НЧ у комбінації з доксорубіцином порівняно з використанням лише цитостатика, що підтверджено оцінкою цитоморфологічних змін, ступеня лікувального патоморфозу та накопичення цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256.

Автором вперше встановлено, що прояви побічної дії протипухлинного препарату на клітини життєво важливих органів таких як печінка, нирки та селезінка тварин з карциносаркомою Уокер-256 за умов комбінованого застосування з Д-ПАА/ZnO НЧ є більш толерантними, а ніж вплив доксорубіцину, що свідчить про перспективність використання наночастинок оксиду цинку в якості цитопротекторів.

Результати досліджень опубліковані у вітчизняних та зарубіжних періодичних виданнях, а також були представлені у вигляді доповідей на фахових наукових конференціях в Україні. Отримані в ході досліджень результати викладено у 10 наукових роботах, зокрема 3 статті, з яких 2, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України та 1 в науковому виданні держави, що входить до Європейського Союзу; отримано 1 патент на корисну модель; 6 праць опубліковано в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій та з'їздів.

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

Обґрунтованість результатів дослідження, формулювання положень та логіка висновків досліджень дисертаційної роботи Вірича Петра Анатолійовича не викликають зауважень. Експериментальне дослідження виконано на клітинах ліній раку передміхурової (LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), лініях нормальних клітин різного гістогенезу (BALB/3T3 клон A31 та MAEC), карциносаркомі Уокер-256 відповідно до сучасних поглядів біоетики щодо експериментальних досліджень. Отримані дані були оброблені статистичними методами. Висновки дисертаційної роботи 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 Вірича Петра Анатолійовича позитивно оцінила дисертаційне дослідження «Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок

оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини (експериментальне дослідження)»(протокол № 4 від 07.03.2024 року).

Таким чином, дисертаційна робота Вірича Петра Анатолійовича 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.

Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

Для вирішення поставлених завдань, дисертантом використано низку сучасних молекулярно-біологічних методів: чутливість клітинних ліній до наносистем досліджували фотометрично після фарбування кристалічним фіолетовим; цитоморфологічні дослідження проводили після фарбування акридиновим оранжевим. Для визначення акумуляції цинку використано барвник N-(6-метокси-8-хінолініл)-4-метилбензенсульфонамід (TSQ), який здатен хелатувати цинк у вигляді іону (Zn^{2+}) та зв'язаний з протеїнами формі; кількісне визначення вмісту цинку вимірювали методом оптично-емісійної спектроскопії з індуктивно пов'язаною плазмою (ICP-OES); визначення кількісних показників загибелі визначали комбінованим фарбуванням Аннексином V-FITC і 7-аміноактиноміцином Д, рівень активних форм кисню визначали фарбуванням розчину за допомогою 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетату та аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра; дослідження маркерів адгезії, апоптозу та проліферації проводили із застосуванням імуноцитохімічної реакції; визначення глюкози та лактату проводили за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора; перещеплення та оцінку динаміки росту модельних пухлин здійснювали за стандартними методиками; гістопатологічне дослідження тканин проводили шляхом зафарбування гематоксиліном та еозином; характеристику наносистем проводили методами спектроскопії, динамічного розсіювання світла та електронної мікроскопії. Таким чином, сучасний методичний рівень роботи, використання 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 фундаментальні дані розширюють існуючі уявлення про біологічні ефекти наночастинок оксиду цинку та їх комплексів. Ідентифікована амбівалентність дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ може бути використана для розробки і впровадження новітніх форм протипухлинних агентів у клінічну практику, оскільки їх застосування в складі схем хіміотерапії хворих на рак дозволить знизити побічні ефекти цитостатиків на нормальні клітини організму і посилити її щодо злоякісних клітин.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота Вірича Петра Анатолійовича викладена українською мовою на 199 сторінках. Робота складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, огляд літератури, матеріалів та методів, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який налічує 261 посилання. Робота проілюстрована 71 рисунком та 3 таблицями.

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

Вступ дисертаційної роботи має інформацію про актуальність, мету та завдання, а також об'єкт, предмет і методи досліджень, які мають відповідну структуру, містить інформацію про наукову новизну та практичне значення виконаної.

У розділі «Огляд літератури» представлено аналіз даних, які стосуються сучасного стану уявлень про роль цинку. Оскільки він є важливим структурним компонентом багатьох ферментів і регуляторних білків клітин та відіграє важливу роль у формуванні імунітету та захисті клітин від злоякісного

перетворення. Дефіцит цинку призводить до проліферації пухлинних клітин, збільшуючи частоту мутагенезу. ZnO НЧ мають вищу проникність і накопичуються у пухлинних клітинах порівняно із здоровими клітинами. Описано, що одним із механізмів інактивації пухлинних клітин є утворення активних форм кисню. ZnO НЧ були ефективними проти різних пухлинних клітин. Описана взаємодія наночастинок цинку із хіміопрепаратами.

Розділ «Матеріали і методи дослідження» містить опис методів, матеріалів та обладнання, які були використанні в ході виконання роботи. Серед яких спектроскопії, динамічного розсіювання світла, електронної мікроскопії, цитоморфологічні, флуоресцентної мікроскопії, протокової цитофлуориметрії, біохімічні, імуноцитохімії, експериментальної онкології, гістологічні, статистичного аналізу.

Розділ «Результати та обговорення» проілюстрований мікрофотографіями, графіками та таблицями. У кожному розділі результатів власних досліджень автор наводить власні джерела цитування. В розділі «Результати та обговорення» викладено технологію синтезу наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ та охарактеризовано її фізико-хімічні властивості. Вивчено цитотоксичну активність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox *in vitro*. Вивчено динаміку акумуляції цинку у злоякісно трансформованих та нормальних клітинах після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ. Проаналізовано зміни морфологічних та адгезивних характеристик та з'ясувати механізми ініціації апоптозу *in vitro*. Вивчено зміни метаболічного статусу клітин після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro*. Досліджено протипухлинну активність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином в системі *in vivo* на моделі карциносаркоми Уокер-256. Проаналізовано цитоморфологічні особливості та акумуляцію цинку у тканині карциносаркоми Уокер -256 та життєво важливих органах тварин після дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» містить огляд сучасних досліджень. Дисертант акцентує увагу на тому, що ідентифікований дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ може бути використаний для розробки і

впровадження новітніх форм протипухлинних агентів у клінічну практику, оскільки їх застосування в складі схем хіміотерапії хворих на рак дозволить знизити побічні ефекти цитостатиків на нормальні клітини організму і посилити її щодо пухлинних клітин, особливо високого ступеня злоякісності.

На підставі комплексних досліджень в системах *in vitro* та *in vivo* автор обґрунтував доцільність застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину.

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

Список використаних джерел складається з 261 посилання на джерела в вітчизняних і міжнародних виданнях. Таким чином, дисертація Вірича Петра Анатолійовича відповідає існуючим вимогам та є завершеною науковою працею, результати якої вирішують актуальну наукову задачу сучасної онкології та мають теоретичне та практичне значення.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці

Отримані результати дисертаційного дослідження Вірича Петра Анатолійовича щодо біологічних ефектів та механізмів дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини можуть бути використані в експериментальних дослідженнях для підвищення вибіркової дії доксорубіцину та зменшення його токсикологічних проявів.

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 03.07.2024 року, унікальність даної роботи станом на 03.07.2024 року становить 98,9% і

відповідно до «Кодексу академічної доброчесності в ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України» допущена 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 розділі 5.3 дисертант вживає термін некроз по відношенню до загальної популяції мертвих клітин.

2. У ході дослідження експресії білків регуляторів апоптозу у нормальних та злоякісно трансформованих клітинах після інкубації з наносистемою дисертанту варто було б врахувати експресію мутантної форми гену TP53.

3. При аналізі отриманих даних дисертанту потрібно було б більш детально розглянути продукти проміжних ланок гліколізу.

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

1. Чому для ефекту дії наносистеми на життєво важливі органи щурів було обрано селезінку, нирки і печінку?

2. Чому саме розрахунок EC50 для досліджуваної наносистеми у комбінації з доксорубіцином здійснювали по концентрації доксорубіцину?

3. Чому у табл 4.2 відсутні значення EC50 для наносистеми у клітинах ліній 3T3 A31 та МАЕС?

4. Попри відсутність змін споживання глюкози у клітинах РПЗ та РМЗ низького ступеня злоякісності спостерігається достовірне зниження вироблення лактату. Як можна пояснити цей феномен?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційне дослідження Вірича Петра Анатолійовича «Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку

на злоякісно трансформовані і нормальні клітини», представлено на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» є самостійною завершеною науковою працею, що містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами і розв'язують важливу наукову задачу – доцільність застосування наносистеми для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину.

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» (зі змінами, внесеними згідно із постановою Кабінету Міністрів України №341 від 21.03.2022р. та постановою Кабінету Міністрів України №502 від 19.05.2023р.), а її автор заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 - Біологія.

Офіційний опонент:

провідний науковий співробітник
науково-клінічного відділу пластичної та
реконструктивної онкоурології
клініки онкохірургії
ДНП «Національний інститут раку»,
доктор мед. наук, старший дослідник

Олег ВОЙЛЕНКО