

ВІДГУК
офіційного опонента, доктора біологічних наук, провідного наукового
співробітника відділу молекулярної онкогенетики
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України
ГЕРАЩЕНКО ГАННИ ВОЛОДИМИРІВНИ
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»

Актуальність роботи

Вдосконалення підходів до підвищення ефективності лікування хворих на рак є пріоритетним напрямком експериментальної та клінічної онкології. Перспективним в цьому аспекті вважається створення різноманітних нанотехнологічних платформ, які можуть бути використані для корекції порушень обміну незамінних мікроелементів у злоякісно трансформованих клітинах та підвищення специфічності дії існуючих протипухлинних препаратів. Накопичений масив знань про порушення гомеостазу цинку на рівні пухлини та організму при розвитку та прогресії найбільш розповсюджених гормонозалежних злоякісних новоутворень є підґрунтям для розробки інноваційних підходів до оптимізації цитостатичної терапії хворих на рак молочної і передміхурової залози. Враховуючи зазначене, актуальність дисертаційної роботи Вірича Петра Анатолійовича, яка присвячена створенню, встановленню властивостей та дослідженню потенційних біологічних механізмів дії наносистеми декстран-ко-поліакриламід/наночастинка оксиду цинку (Д-ПАА/ZnO НЧ) в системах *in vitro* та *in vivo* та обґрунтуванню доцільності її використання для зниження токсикологічних проявів

хіміопрепаратів на прикладі доксорубіцину при лікуванні гормонозалежних злоякісних новоутворень, не викликає сумнівів і є найвищою мірою затребуваною для сучасної теоретичної й експериментальної науки та медицини.

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

Для дисертаційної роботи обрані дуже об'ємні об'єкт та предмет досліджень. Але достовірність та обґрунтованість викладених у дисертації наукових положень забезпечена достатньою кількістю моделей *in vitro* та *in vivo*, коректним плануванням експериментів та використанням широкого спектру методів дослідження, адекватних конкретно сформульованій меті та задачам дослідження, а також використанням адекватних методів статистичного аналізу отриманих даних.

Завдання сформульовані чітко та об'ємно й реалізовані у повній мірі. Висновки відповідають меті та задачам дослідження, добре обґрунтовані, правомірні, оскільки впливають і добре описаних результатів дисертації, базуються на аналізі та узагальненні отриманих власних даних та є логічним завершенням роботи.

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

У дисертаційній роботі Вірича Петра Анатолійовича з використанням низки сучасних молекулярно-біологічних методів вперше ідентифіковано біологічні ефекти наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ по відношенню до нормальних та злоякісно трансформованих клітин різного гістогенезу та обґрунтовано доцільність її застосування для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину.

Вперше розроблено технологію створення наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ із попередників цинк ацетату та цинк сульфату з розмірами ZnO НЧ 2-4 нм.

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 робіт, 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

Достовірність та обґрунтованість викладених у дисертації наукових положень забезпечена достатньою кількістю експериментальних моделей: 3 лінії раку передміхурової залози (LNCaP, DU-145, PC-3), 3 лінії раку молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), та 2 лінії нормальних клітин різного гістогенезу (BALB/3T3 клон A31 та MAEC), штам карциносаркоми Уокер-256 відповідно до сучасних поглядів біоетики щодо експериментальних досліджень.

Науковий та методичний рівень дисертації є високим, а застосування сучасних методів дослідження та використання статистичної обробки матеріалів дозволили отримати науково-обґрунтовані та достовірні висновки.

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 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 досягнення поставленої мети дисертантом використано низку сучасних та адекватних завданням високоінформативних методів дослідження, які належать до різних галузей біології, біофізики, експериментальної онкології, клітинної біології, зокрема: цитоморфологічний, імуноцитохімічний, фотометричний, оптично-емісійної спектрометрії з індуктивно пов'язаною плазмою, проточної цитофлуориметрії, спектроскопії, динамічного розсіювання світла, електронної мікроскопії та інші. Таким чином, сучасний методичний рівень роботи, висока інформативність використаних методів дослідження та адекватність статистичного аналізу дозволяють стверджувати, 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 механізми дії наночастинок оксиду цинку та їх комплексів та вказують на перспективність використання наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ у схемах

протипухлинного лікування хворих на рак, що сприятиме зниженню побічних ефектів цитостатиків. Розроблена технологія створення наносистеми із наночастинками оксиду цинку може бути використана в експериментальних дослідженнях для підвищення вибіркової дії доксорубіцину та зменшення його токсикологічних проявів.

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 представляє короткий виклад змісту дисертаційного дослідження, наводить перелік публікацій, в яких викладені основні результати представленого дослідження. Анотація викладена українською і англійською мовами.

У «Вступі» дисертаційної роботи визначено об'єкт та предмет дослідження, інформацію про апробацію, актуальність, мету та завдання, методи досліджень, містить інформацію про наукову новизну та практичне значення виконаної роботи.

У розділі «Огляд літератури» представлено існуючі уявлення про роль цинку у життєво важливих процесах та порушення гомеостазу цього мікроелементу при виникненні патологічних станів і злоякісних новоутворень. Розглянуто проблемні аспекти та перспективи застосування наночастинок оксиду цинку як терапевтичних засобів для лікування злоякісних новоутворень. Фізико-хімічні властивості наночастинок оксиду цинку. Даний розділ складається з шести частин, які відображають основні напрямки досліджень проблеми, що вивчається. При написанні огляду літератури здобувачем

проаналізовано достатню кількість літературних джерел, у тому числі іноземних публікацій, із них більше половини за останні роки.

Розділ «Матеріали і методи дослідження» містить опис методів, матеріалів та обладнання, які були використані в ході виконання роботи. Автор надає загальну характеристику експериментальних моделей, на яких проводились дослідження, а також методи використані для синтезу та фізико-хімічної характеристики наносистем, вивчення цитотоксичності та механізмів дії наносистем в системі *in vitro*, а також дослідженню їх протипухлинної активності в системі *in vivo*. Наприкінці цього розділу наведено методи статистичної обробки даних, отриманих при виконанні дослідження.

«Результати та обговорення» дисертаційної роботи викладені у 4 розділах, кожен з яких проілюстрований мікрофотографіями, графіками та таблицями. У кожному розділі результатів власних досліджень автор наводить посилання на власні публікації. Третій розділ роботи присвячений розробці та вивченню фізико-хімічних характеристик наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ та дослідженню особливостей їх взаємодії з доксорубіцином. В першому та другому підрозділах четвертого розділу дисертант детально описує результати дослідження цитотоксичної активності наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ по відношенню до злоякісно трансформованих та нормальних клітин в системі *in vitro*, а у третьому підрозділі цього розділу наводить отримані дані щодо цитотоксичності *in vitro* наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ при одночасному застосуванні з доксорубіцином. П'ятий розділ дисертаційної роботи присвячений вивченню молекулярно-біологічних механізмів дії наносистем Д-ПАА/ZnO НЧ *in vitro* на підставі дослідження динаміки акумуляції цинку, генерації активних форм кисню, експресії білків-регуляторів апоптозу та міжклітинної адгезії, а також оцінки метаболічного статусу злоякісно трансформованих та нормальних клітин з використанням цитоморфологічних, імуноцитохімічних, біохімічних та фотометричних методів, а також методу проточної цитофлуориметрії. У шостому розділі наведені результати

дослідження протипухлинної активності наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином та її складових в системі *in vivo* на моделі карциносаркоми Уокер-256.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» автор, обговорюючи власні дані, зіставляє їх з відомостями літератури, а також висловлює власну думку з приводу отриманих результатів та пов'язаних ними питань.

У дисертаційній роботі викладено теоретичні основи і після низки експериментальних досліджень окреслено перспективи застосування Д-ПАА/ZnO НЧ разом з хіміопрепаратами при лікуванні хворих на рак, що дозволить знизити побічні ефекти цитостатиків на нормальні клітини організму.

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 у 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-кополіакриламід 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. Ця дисертаційна робота має дуже високий потенціал для практичного впровадження, що є безмежно актуальним для ефективного лікування хворих на рак.

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 03.05.2024 року становить 98,9% і відповідно до «Кодексу академічної доброчесності в ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України» робота допущена до захисту.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

Дисертаційна робота оформлена згідно затверджених вимог для дисертаційних робіт (Наказ МОН України №40 від 12.01.2017).

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

Зауваження:

1. У Змісті роботи не дуже вдало використані скорочення «РМЗ» та «РПЗ» – краще у цьому місті було б написати повністю «рак молочної залози» та «рак передміхурової залози»
2. У Змісті в Розділі 2 Матеріали та методи та с.21 краще було б більш чітко написати що таке «стандартні» «методи експериментальної онкології»
3. У списку умовних позначень не дуже вдало змішувати українські та англійські скорочення та відсутнє скорочення основного компоненту дослідження «Д-ПАА/ZnO»
4. На деяких рисунках зустрічаються англійські позначення.
5. У розділі 6.3, потрібно було збільшити розмір рисунків, для кращої візуалізації змін досліджуваних тканин.

6. Для більшої об'єктивізації отриманих даних щодо можливості використання наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ в якості цитопротектора доксорубіцину бажано було дослідити кількісний вміст цинку у тканині пухлини та життєво важливих органів, а також вивчити біохімічні та загально-клінічні показники крові експериментальних тварин.

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

1. Чому на вашу думку збільшується ефективність наносистеми при збільшенні рівня злоякісності клітин *in vitro*?

2. Які зміни морфології клітин Ви спостерігали при додаванні наносистеми Д-ПАА/ZnO до злоякісно трансформованих та нормальних клітин? Чим Ви пояснюєте виявлену Вами різницю у чутливості та відповіді різних клітин на хіміотерапію з нанопрепаратом?

3. Чому Ви обрали саме таку систему *in vivo* для свого дослідження? Які її переваги?

4. Розкрийте поняття «метаболічний статус клітин». Які Ви вважаєте важливими показники цього статусу та сучасні методи їх дослідження.

5. Якими сучасними методами та які параметри Ви вважаєте адекватно оцінюють механізми ініціації апоптозу в клітинах.

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», представлене 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 отриманої та дослідженої

наносистеми для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину при терапії онкологічних хвороб.

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:

**Доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник
відділу молекулярної онкогенетики
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України**

Ганна Геращенко