

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, доктора біологічних наук, старшого наукового співробітника, завідуючого відділом засобів та методів сорбційної терапії

Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р.Є. Кавецького НАН України

САРНАЦЬКОЇ ВЕРОНІКИ В'ЯЧЕСЛАВІВНИ

на дисертаційну роботу

ВІРИЧА ПЕТРА АНАТОЛІЙОВИЧА

на тему

«БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ ТА МЕХАНІЗМИ ДІЇ ДЕКТРАН-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»

Ступінь актуальності обраної теми

Відомо, що рак молочної залози (РМЗ) та передміхурової залози (РПЗ) являються найпоширенішими онкологічними захворюваннями у жінок та чоловіків. Хоча ці органи і відрізняються за анатомією та фізіологією, обидва вимагають для свого розвитку статевих гормонів, а пухлини, які виникають в них, зазвичай є гормонозалежними та мають значну біологічну схожість. Розвиток пухлин різного генезу супроводжується репрограмуванням метаболізму цинку за різними шляхами, який є другим за поширеністю незамінним мікроелементом в організмі людини, залученим до регуляції значної кількості фізіологічних функцій та біологічних процесів. Фундаментальними дослідженнями останніх років доведено, що порушення обміну цинку відіграє ключову роль у розвитку та прогресії раку молочної та передміхурової залози. Вважається, що розвиток та прогресія РПЗ асоціюється зі зменшенням рівня цинку у пухлинних клітинах, а при виникненні РМЗ - збільшення концентрації цього мікроелементу. Саме тому розробка підходів щодо корекції рівня цинку у злоякісно трансформованих клітинах є пріоритетним напрямком.

Застосування технології на основі наноматеріалів відкриває нові можливості у діагностиці та лікуванні раку. Перспективним у цьому аспекті вважається використання наночастинок оксиду цинку, які за фізіологічних умов є малотоксичними і володіють здатністю до селективного пошкодження злоякісно трансформованих клітин за рахунок зміни експресії цинк-залежних білків, що сприяє активації генерації активних форм кисню та індукції апоптозу. Сьогодні потреби онкології активізували наукові біотехнологічні дослідження, спрямовані на створення нанокомпозитів, в тому числі на основі наночастинок ZnO із включенням протипухлинних препаратів. Завдяки своїм властивостям ці наночастинки здатні здійснювати міжклітинний та внутрішньоклітинний транспорт протипухлинних препаратів до біомішені та контрольоване вивільнення субстанції з лікарської форми, тим самим покращуючи фармакодинаміку та фармакокінетику. Існуючі фундаментальні розробки в галузі нанотехнології мають певні перспективи для створення нанокомплексів, до складу яких входять стабілізовані наночастинки ZnO та протипухлинні препарати для ефективної таргетної доставки їх у злоякісно трансформовані клітини. Проте, незважаючи на активні пошуки, відкритими залишаються питання щодо вибору компонентів для стабілізації наночастинок оксиду цинку у водних розчинах з метою зменшення їх схильності до агрегації. Водночас, відсутні дані щодо протипухлинної активності цитостатиків в присутності ZnO наночастинок, а також не з'ясовані механізми їх сумісної дії та біологічної активності.

Наведене чітко аргументує нагальну необхідність проведення подальших досліджень щодо застосування стабілізованих ZnO наночастинок в онкології і вивчення їх біологічних ефектів. Дослідження властивостей одержаних матеріалів є важливою та актуальною проблемою. Саме цьому і присвячена дисертаційна робота Вірича Петра Анатолійовича.

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

Дослідження було виконано в лабораторії механізмів медикаментозної резистентності ІЕПОР імені Р.Є. Кавецького НАН України у рамках 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 науковців під назвою «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

На основі чітко сформульованих завдань, використання комплексного методичного підходу, який включав достатній за кількістю комплекс сучасних лабораторних високочутливих методів дослідження, дисертанту вдалося досягти мети, яка була поставлена в роботі.

Обсяг проведених досліджень, використані методи статистичного аналізу отриманих результатів і самі отримані результати зумовили достовірність зроблених автором висновків.

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

Більшість основних наукових положень, сформульованих у дисертації Вірича П.А. є новими для науки. Вперше автором роботи було отримано ряд нових важливих результатів, а саме:

- розроблено технологію синтезу наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ із попередників цинк ацетату (OAc-) та цинк сульфату (SO₄²⁻) за розмірами 2-4 нм.
- В системі *in vitro* встановлено, що цитотоксичність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) відносно клітин лінії раку передміхурової залози

(LNCaP, DU-145, PC-3) та молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) була більшою, з показниками EC50 у діапазоні концентрацій 2,2 – 2,81 мМ, порівняно з наносистемою Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОAc).

- з'ясовано, що цитотоксичність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином по відношенню до клітин ліній раку молочної та передміхурової залози високого ступеня злоякісності є більшою порівняно з окремою дією цитостатику.
- визначено динаміку акумуляції цинку у клітинах раку передміхурової залози, молочної залози та нормальних клітинах.
- показано, що наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ здатна викликати у клітинах високого ступеня злоякісності підвищення рівня АФК, транслокацію фосфатидилсерину на поверхню клітин та зміну співвідношення білків-регуляторів апоптозу.
- виявлено цитопротекторні властивості наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ щодо нормальних клітин, що вказує на її вибірккову селективну цитотоксичність.
- встановлено, що наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ зумовлює зниження споживання глюкози клітинами раку передміхурової залози (лінії DU-145 і PC-3 на 15-20%) та молочної залози (лінія MDA-MB-231 на 40%), а також зниження продукції лактату.
- в експериментах *in vivo* доведено протипухлинну активність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ. Виявлено, що застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ пом'якшує прояви побічної дії доксорубіцину на клітини життєво важливих органів тварин (печінка, нирки та селезінка) тварин з карциносаркомою Уокер-256.

Викладене визначає новизну і фундаментальне наукове значення основних наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації Вірича П.А.

Результати проведених досліджень були опубліковані у наукових журналах як в Україні, так і за кордоном, а також представлені у вигляді доповідей на спеціалізованих наукових з'їздах та конференціях в Україні. Експериментальні дані висвітлено в 10 наукових роботах: 3 статті, отримано 1 патент на корисну модель, а також 6 тез на міжнародних конференціях та з'їздах.

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

Автором дисертаційної роботи виконаний великий об'єм експериментальних досліджень та проведений ґрунтовний аналіз одержаних даних. Дослідження було проведено на клітинах ліній раку передміхурової залози (LNCaP, DU-145, PC-3), молочної залози (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231), карциносаркомі Уокер-256, а також на нормальних клітинах різного гістогенезу (BALB/3T3 клон А31 та МАЕС) згідно сучасних етичних стандартів у сфері експериментальних досліджень.

Задачі дисертаційної роботи Вірича Петра Анатолійовича були повністю розкриті, за результатами яких автору вдалося дуже переконливо продемонструвати перспективність застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зниження токсичних проявів доксорубіцину. Отримані висновки адекватно відображають поставлені мету та завдання даного дослідження.

У методичному аспекті наукова робота побудована, структурована і виконана правильно. Обсяг проведених досліджень, використані методи статистичного аналізу отриманих результатів і самі отримані результати зумовили достовірність зроблених автором висновків і рекомендацій.

Комісія з питань етики ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України позитивно оцінила дотримання етичних принципів у дослідженні Вірича Петра Анатолійовича «Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід

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

Результати цієї роботи, що виносяться на захист для здобуття ступеня доктора філософії, є достовірними і обґрунтованими, відрізняються новизною та мають значну практичну цінність.

Рівень виконання поставленого наукового завдання, оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності

На основі чітко сформульованих завдань, використання комплексного методичного підходу, який включав методи експериментальної онкології цитоморфологічні, імуноцитохімічні, імуногістохімічні методи дослідження, а також високочутливі інструментальні, фізико-хімічні, біохімічні, та математичні методи аналізу, дисертанту вдалося досягти мети, яка була поставлена в роботі.

Для вирішення поставлених завдань дисертантом було опановано ряд сучасних методів аналізу. Для характеристики наносистем автор використовував методи спектроскопії, динамічного розсіювання світла та електронної мікроскопії. Оцінку чутливості клітин дисертант проводив методом фотометричного аналізу після фарбування кристалічним фіолетовим, а для цитоморфологічних досліджень проводилось фарбування акридиновим оранжевим. Для визначення накопичення цинку був використаний барвник TSQ, який хелатує цинк у вигляді іону та у зв'язаній з протеїнами формі, а кількість цинку визначалася методом оптично-емісійної спектрометрії з індуктивно пов'язаною плазмою. Для визначення кількісних показників загибелі клітин автор проводив комбіноване фарбування Аннексином V-FITC і 7-аміноактиноміцином Д, а рівень активних форм кисню вимірював фарбуванням розчином 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетату і цитофлуориметричного аналізу. Дослідження маркерів адгезії, апоптозу та проліферації проводились автором за

допомогою імуноцитохімічних методів. Рівні глюкози та лактату визначалися із застосуванням автоматичного біохімічного аналізатора. Перещеплення та оцінка динаміки росту модельних пухлин, а також гістологічні дослідження тканин здійснювалися дисертантом за стандартними методиками.

Таким чином, високий рівень виконання поставленого наукового завдання, висока методична якість роботи, використання сучасних методів дослідження та адекватний статистичний аналіз свідчать про те, що результати дослідження відповідають поставленій меті і завданням, а висновки, сформульовані Віричем П. А. у дисертаційній роботі, є достовірними та науково обґрунтованими.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Одержані результати розширюють існуючі уявлення про механізми взаємодії наночастинок оксиду цинку і їх комплексів з нормальними і злоякісно трансформованими клітинами та мають бути науковим підґрунтям для подальшого використання наносистем з наночастинок оксиду цинку для підвищення специфічної дії доксорубіцину та зменшення його токсичних ефектів.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому

Дисертаційна робота Вірича Петра Анатолійовича написана українською мовою і має обсяг 199 сторінок. Робота ілюстрована 71 рисунком і 3 таблицями та містить 261 посилання на джерела літератури. Анотація відображає основні тези дисертаційного дослідження і містить перелік публікацій, в яких представлені ключові результати роботи. Анотація написана українською та англійською мовами.

У Вступі обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету та завдання дослідження, обґрунтовано наукову новизну роботи та практичне значення отриманих результатів, зазначено особистий внесок здобувача і проведення апробації основних положень дисертації

В розділі "Огляд літератури" здобувачем окреслені основні етапи розвитку наукової думки за даною темою, стисло і критично висвітлені роботи попередників, визначені питання, що залишились невирішеними. Розділ структурований на підрозділи і відображає основні напрямки роботи, містить сучасні дані про роль цинку в гомеостазі нормальних і злоякісно трансформованих клітин, фізико-хімічні характеристики наночастинок оксиду цинку та їх вплив на організм людини, а також інформацію про синергетичні і протекторні властивості цих наночастинок у взаємодії з різними хіміопрепаратами.

Відбір літературних джерел, їх критичний аналіз засвідчує про високу ерудицію дисертанта.

У розділі "Матеріали і методи дослідження" описані сучасні методи, матеріали та обладнання, що використовувалися для дослідження фізико-хімічних характеристик наносистем, чутливості клітинних ліній до препаратів, цитоморфологічних досліджень, визначення концентрацій цинку, рівня активних форм кисню, фосфатидилсерину, змін метаболізму клітин, дослідження протипухлинної активності та статистичної обробки даних.

Розділ "Результати та обговорення" структурований на підрозділи, містить багато мікрофотографій, графіків і таблиць. В кожному підрозділі результатів досліджень автор наводить відповідні джерела цитування. В цьому розділі міститься наукова інформація, отримана автором в результаті виконання дисертаційної роботи. Описано технологію синтезу наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з попередників цинк ацетату та цинк сульфату розмірами ZnO НЧ 2-4 нм і описано їх фізико-хімічні властивості. В системі *in vitro* показано, що цитотоксичність наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) щодо клітин ліній раку РМЗ і РПЗ є більшою, з показниками EC₅₀ у межах 2,2 – 2,81 мМ, ніж у наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(-OAc), з'ясовано, що комбінована протипухлинна дія наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином є більш ефективною в порівнянні з окремою дією цитостатику на клітини раку РМЗ і РПЗ високого ступеня злоякісності. Методом флуоресцентної мікроскопії з використанням

TSQ для хелатування цинку описана динаміка накопичення цинку у клітинах РМЗ і РПЗ, а також у нормальних клітинах.

Експериментально доведено, що біологічна дія наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ реалізується через індукцію апоптозу і викликає у клітинах високого ступеня злоякісності значне підвищення рівня активних форм кисню, транслокацію фосфатидилсерину на поверхню клітини, що призводить до виражених змін у клітинах РМЗ і РПЗ, зниження їх проліферативної активності і підвищення адгезивних властивостей. Визначені слабкі ознаки апоптотичної загибелі нормальних клітин свідчать про їх цитопротекторні властивості і селективну цитотоксичність. Встановлено, що наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ знижує споживання глюкози клітинами раку РПЗ (лінії DU-145 і PC-3 на 15-20%) і РМЗ (лінія MDA-MB-231 на 40%) та зменшує продукцію лактату на 20-30% у всіх лініях злоякісно трансформованих і нормальних клітинах МАЕС.

В експериментах *in vivo* продемонстровано переваги використання наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності та зменшення токсичних проявів доксорубіцину. Показано, що побічні ефекти доксорубіцину на життєво важливі органи тварин (печінка, нирки і селезінка) при комбінованому застосуванні з Д-ПАА/ZnO НЧ є значно менш вираженими, ніж при окремому застосуванні доксорубіцину.

Розділ "Аналіз і узагальнення результатів досліджень" містить посилання на огляди сучасних експериментальних досліджень. Дисертант підкреслює, що дія наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ може бути використана для підвищення специфічності дії доксорубіцину та зменшення його токсичних ефектів.

На основі комплексних досліджень *in vitro* та *in vivo* обґрунтовано доцільність застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для підвищення протипухлинної активності і зменшення токсичних проявів доксорубіцину. Висновки дисертації відповідають меті та завданням роботи і пов'язані з отриманими результатами.

Таким чином, дисертація Петра Анатолійовича Вірича відповідає сучасним вимогам і є завершеним науковим дослідженням, яке вирішує актуальні задачі сучасної онкології та має значне теоретичне і практичне значення.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів дисертації в практиці

Результати дисертаційного дослідження Петра Анатолійовича Вірича, що стосуються біологічних ефектів і механізмів дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку на пухлинні та нормальні клітини, можуть бути використані в експериментальних дослідженнях для покращення специфічності протипухлинної дії доксорубіцину та зменшення його токсичних ефектів.

Відсутність (наявність) порушень академічної доброчесності.

Відповідно до експертного висновку про перевірку на академічний плагіат, затвердженого директором Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, доктором біологічних наук, професором Л.Г. Бучинською 3.05.2024 року, унікальність цієї роботи на зазначену дату становить 98,9%. Згідно з «Кодексом академічної доброчесності ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України», робота допускається до захисту.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

Під час рецензування дисертації були виявлені деякі зауваження щодо оформлення, які не зменшують важливість роботи та значимість одержаних результатів. Ці зауваження стосуються доповнення та вдосконалення роботи.

Зауваження:

1. У розділах дисертації зустрічаються орфографічні помилки, механічні описки, невдалі стилістичні вирази.
2. Підрозділ 1.6.4 розділу «Огляд літератури» бажано було б розширити, доповнивши його додатковою інформацією щодо біологічних та інших

властивостей наночастинок оксиду цинку, функціоналізованих різними органічними та неорганічними сполуками.

3. У підрозділі 5.1, розміри рисунків доцільно було б збільшити для надання читачам можливості для детального візуального аналізу всіх зміни, які виникають в клітинах під час акумуляції цинку.

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

1. Яким чином може бути пояснена знижена чутливість нормальних клітин ліній 3T3 A31 та МАЕС до досліджуваної наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ порівняно із злоякісно трансформованими клітинами?

2. Враховуючи неможливість розрахунку EC50 для клітин 3T3 A31 та МАЕС, яку концентрацію наносистеми використовували для подальших досліджень?

3. Яким чином можете пояснити механізми зниження рівня цинку з часом після його експонентного росту впродовж перших годин дослідження *in vitro*?

4. У 8 висновку дисертаційної роботи стверджується про доцільність використання наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ для зниження токсичних ефектів доксорубіцину, чи варто, в такому разі, очікувати на послаблення кардіотоксичності та інших системних побічних реакції, що значно обмежують клінічне застосування цього цитостатика?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційне робота Вірича Петра Анатолійовича «Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини», представлена на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія», є самостійною завершеною науковою працею, що містить новітні наукові положення, обґрунтовані отриманими результатами. Представлена автором дисертації наносистема 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 їх протипухлинну активність.

Дисертаційна робота Вірича П.А. «Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини» є актуальною, виконаною на високому професійному рівні, має велику практичну та соціальну значимість. Висновки обґрунтовані і відповідають поставленим задачам, мета роботи – досягнута. 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 рецензент:

**Доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
Завідувач відділу засобів та методів
сорбційної терапії
ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України**

Вероніка САРНАЦЬКА