

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента, кандидата біологічних наук, старшого наукового
співробітника відділу генетики раку та онкогематології
Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
ШЛАПАЦЬКОЇ ЛАРИСИ МИКОЛАЇВНИ

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 обраної теми досліджень.

На сьогодні онкологічні захворювання займають другу позицію за причиною смертності у всьому світі. Основними методами лікування даних захворювань прийнято вважати хіміотерапію, променеву терапію та оперативні втручання, проте хоча ці методи лікування дуже ефективні, але також призводять до багатьох серйозних побічних ефектів, що знижують якість життя пацієнтів. Останнім часом для подолання цих побічних ефектів увагу дослідників привернули засновані на нанотехнологіях високофункціональні наносистеми з високою біосумісністю, здатні доставляти ліки до пухлинних клітин. Наночастинки оксиду цинку (ZnO) обрані у якості потужної наноплатформи в секторі охорони здоров'я завдяки їх різноманітним властивостям. Встановлено, що окрім протипухлинних характеристик вони мають виразні антибактеріальні та ранозагоювальні властивості, володіють сильними каталітичними та фотохімічними ефектами.

Протипухлинну дію наночастинок ZnO (ZnO НЧ) можна пояснити кількома потенційними механізмами:

- шляхом накопичення внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК) у злоякісно трансформованих клітинах, що призводить до пошкодження ДНК і, зрештою, до загибелі клітини. Окрім цього, АФК зумовлюють руйнування клітинної мембрани та зміну її проникності, що супроводжується зростанням акумуляції хіміотерапевтичних препаратів у клітинах;
- шляхом індукції апоптозу, як результату активації ряду сигнальних шляхів;
- порушенням функцій мітохондрій, які відіграють життєво важливу роль у регуляції різних клітинних процесів, включаючи апоптоз та енергетичний обмін.

Комплексно ці ефекти сприяють селективній токсичності ZnO НЧ щодо злоякісно трансформованих клітин, що робить їх перспективним кандидатом у лікуванні злоякісних новоутворень поряд із традиційними методами лікування. На сьогодні ZnO НЧ отримали набагато більше уваги і завдяки їх фотокаталітичним та фотоокислювальним властивостям по відношенню до злоякісно трансформованих клітин. Враховуючи, що порушення обміну цинку найбільш фіксують при розвитку гормонозалежних злоякісних новоутворень, перспектива їх застосування при даних патологіях повна надій. Підґрунтям для можливості використання ZnO НЧ у складі наносистем, а також разом із хіміопрепаратами в клінічній онкології, з'ясування механізмів їх дії, дослідження цитотоксичних ефектів та молекулярних змін в нормальних та злоякісно трансформованих клітинах є, перш за все, дослідження в системах *in vitro* та *in vivo*. Саме такий комплексний підхід і було застосовано у дисертаційній роботі П.А.Вірича, який дозволив з'ясувати і обґрунтувати доцільність застосування розробленої ZnO НЧ вмісної наносистеми, яка за умов комплексного застосування з доксорубіцином послаблює його токсикологічні прояви, що є нагальним питанням сьогодення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у лабораторії механізмів медикаментозної резистентності Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р.Є. Кавецького НАН України в рамках науково-дослідної роботи «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 наукових положень, отриманих результатів, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації.

Аналіз змісту дисертаційної роботи П.А. Вірича «Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини (експериментальне дослідження)» та опублікованих праць дозволяє стверджувати про належне теоретичне та методологічне обґрунтування наукових положень та висновків проведених наукових досліджень та достовірність отриманих результатів. Для реалізації мети досліджень автором були визначені вісім задач, які повністю відображають зміст роботи, є взаємопов'язаними і логічно обґрунтовують необхідність їх виконання. Робота проведена на шести модельних системах ліній клітин людини раку молочної залози, раку передміхурової залози, двох лініях нормальних клітин різного гістогенезу *in vitro* та карциносаркомі Уокер-256 *in vivo* із застосуванням сучасних біохімічних, імуноцитохімічних, цитоморфологічних методів, методів проточної цитометрії, культури клітин, експериментальної онкології, спектроскопії, динамічного розсіювання світла, трансмісійної електронної мікроскопії. Всі результати досліджень були статистично оброблені і викладені у висновках, які відображають основні результати дослідження, отримані згідно поставлених задач. Комісія з питань етики ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України щодо дотримання етичних принципів при виконанні наукових досліджень 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). Отже, дисертаційна робота містить належний рівень доказовості та обґрунтованості наукових положень, результатів досліджень та висновків.

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

Наукова новизна дисертаційної роботи Вірича Петра Анатолійовича «Біологічні ефекти та механізми дії декстран-ко-поліакриламід наночастинок оксиду цинку на злоякісно трансформовані і нормальні клітини (експериментальне дослідження)» безсумнівна і містить наступні здобутки:

- вперше отримано наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ із попередників цинк ацетату (OAc-) та цинк сульфату (SO_4^{2-}) розмірами ZnO НЧ 2-4 нм, ефективність яких у комбінації з доксорубіцином є більшою порівняно з окремою дією цитостатику по відношенню до клітин ліній раку молочної та передміхурової залози високого ступеня злоякісності і супроводжується зниженням цитотоксичного ефекту по відношенню до нормальних клітин;

- вперше показано, що комбіноване використання наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином в системі *in vivo* достовірно підвищує внутрішньоклітинну концентрацію цинку у тканині карциносаркоми Уокер-256, порівняно з використанням лише цитостатика та селективно знижує цитотоксичні ефекти доксорубіцину на клітини життєво важливих органів (печінка, нирки та селезінка) тварин;

- обґрунтовано механізми дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ на злоякісно трансформовані клітини людини, які включають: регуляцію рівня Zn^{2+} в клітинах; зменшення їх проліферативної активності; індукцію загибелі клітин шляхом апоптозу та некрозу, що супроводжується достовірним зростанням рівня експресії проапоптичних білків Вах, р53 та зниженням експресії антиапоптичного білка Bcl-2; зростання рівня експресії деяких молекул адгезії (Е-кадгерину, N-кадгерину), що опосередковує послаблення процесів інвазії;

- протипухлинна дія наночастинок наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ супроводжується достовірним зростанням рівня АФК, зменшенням вироблення

лактату в клітинах ліній РПЗ та РМЗ та зниженням споживання глюкози в клітинах ліній високого ступеня злоякісності.

Результати досліджень повністю відображені у 10 наукових роботах: у 3 статтях, дві з яких опубліковані у журналах, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України та одна у закордонному науковому виданні (International journal of nanomedicine), віднесеного до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації Scimago Journal and Country Rank; одному патенті на корисну модель та шести тезах, опублікованих в наукових збірниках і матеріалах міжнародних та українських наукових конференцій та з'їздів, що підтверджує наукову вагомість отриманих результатів. Опубліковані праці відповідають вимогам п.8 Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44. Окрім цього, результати досліджень були апробовані автором на численних вітчизняних та міжнародних наукових форумах у вигляді усних доповідей. Все висвітлене вище дозволяє стверджувати, що результати дисертаційного дослідження належним чином були представлені науковій спільноті для ознайомлення.

Практичне значення результатів дисертаційної роботи.

Результатом проведеного дисертаційного дослідження є створення нової вітчизняної наносистеми, складовими якої є декстран-ко-поліакриламід та наночастинки оксиду цинку, яка потенційно може бути рекомендована для розробок підходів щодо підвищення внутрішньоклітинної концентрації Zn^{2+} та активації процесів загибелі пухлинних клітин. Комплексне застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином є більш ефективним, аніж доксорубіцину у монорежимі, оскільки призводить до інгібування токсичних проявів препарату на нормальні клітини організму на тлі цитоморфологічних змін та ознак лікувального патоморфозу пухлинної тканини, що є підґрунтям для подальших досліджень і практичного застосування отриманих результатів.

Оцінка структури та змісту дисертації.

Робота викладена на 199 сторінках із дотриманням існуючих вимог, затверджених до оформлення дисертації, і складається із анотацій, вступу, огляду літератури та розділів, у яких представлено матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень (4 розділи), аналіз та узагальнення отриманих даних, висновків. Список літературних джерел налічує 261 посилань, 51% яких опубліковані за останні 5 років. Роботу ілюстровано 71 рисунком та 3 таблицями.

У *вступі* обґрунтована актуальність теми дослідження, чітко сформульована мета та 8 завдань досліджень, викладені наукова новизна і практична значимість отриманих результатів, відомості про особистий внесок здобувача, апробацію та публікацію результатів виконаної дисертаційної роботи, що дає цілісне уявлення про суть і зміст роботи. Слід зазначити, що робота була успішно виконана згідно поставлених завдань, що відображено у висновках роботи.

В *огляді літератури* автор викладає матеріал, який виключно стосується теми дисертаційного дослідження і акцентує увагу на місці і ролі цинку у функціонуванні нормальних та злоякісно трансформованих клітин, зупиняється на питаннях розробки наносистем з наночастинками оксиду цинку, їх перевагами над іншими наносистемами, що обґрунтовує необхідність проведення запланованих досліджень.

Другий розділ дисертаційної роботи – «Матеріали і методи дослідження» відображає великий спектр методичних підходів, які використав дисертант для вирішення завдань дослідження і поставленої мети, що заслуговує на схвалення. Всі застосовані при виконанні роботи методичні підходи детально описані і можуть бути відтворені.

Розділ 3. Застосувавши метод динамічного розсіювання світла, оптичного поглинання та флуоресценції, трансмісійної електронної мікроскопії встановлено, що розмірні характеристики наносистем Д-ПАА/НЧ ZnO (OAc) і ZnO НЧ при синтезі наночастинок з цинк ацетату є більшими за такі, аніж при синтезі наночастинок з попередників цинк сульфату (SO_4^{2-}).

Розділ 4. Представлені результати досліджень дозозалежних цитотоксичних ефектів Д-ПАА/ZnO НЧ(-ОАс) та Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) на клітини ліній раку молочної (MCF-7, MCF-7 Dox, MDA-MB-231) та передміхурової залози (LNCaP, DU-145, PC-3), а також на нормальні мишачі ендотеліальні клітини аорти (МАЕС) та мезенхімальні клітини ембріонів мишей (BALB/3Т3 клон А31). Встановлено, що показниками EC50 наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) для всіх клітинних ліній РМЗ та РПЗ є достовірно менші, аніж наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(ОАс) (2,2-2,81 мМ vs 17,3-26,3 мМ). Цитотоксичні ефекти обох наносистем щодо нормальних клітин були значно нижчими порівняно з клітинами РМЗ та РПЗ, що свідчить про селективність їх дії. Важливо відмітити, що на відміну від відомих аналогів ZnO НЧ-вмісних наносистем, за умов застосування наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) 90% бар'єр загибелі більшості досліджених клітин ліній РМЗ та РПЗ досягається при значно менших концентраціях ZnO НЧ - 3,1 – 6,2 мМ, що дає підставу вважати розроблені наносистеми конкурентноздатними та перспективними у подальшому вивченні. Водночас в результаті культивування нормальних клітин з ZnO НЧ в концентрації 50 мМ максимальний відсоток мертвих клітин складав лише 54,7% та 20,6% для Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) та Д-ПАА/ZnO НЧ(ОАс) відповідно. Також у даному розділі заслуговує на увагу висновок стосовно підвищення цитотоксичності системи Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox у порівнянні із дією самого препарату на деякі клітинні лінії РМЗ та РПЗ та зниження даного ефекту по відношенню до досліджуваних нормальних клітин.

Розділ 5 присвячено вивченню механізмів дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ(SO₄²⁻) в системах *in vitro*. Автором досліджено кінетику акумуляції Zn²⁺ та його вивільнення у цитозоль як нормальними клітинами 3Т3 А31 та МАЕС, так і клітинами ліній РМЗ та РПЗ різного ступеня злоякісності. Статистично доведено, що у злоякісно трансформованих клітинах процес накопичення Д-ПАА/ZnO НЧ починається раніше, аніж в нормальних клітинах і реєстрація Zn²⁺ вмісних везикул відбувається вже через 15- 30 хв у більшості клітин РМЗ та РПЗ, тоді як у нормальних клітинах – лише після 45 хв культивування з наноконкомпозитом. Клітини ліній РМЗ та РПЗ дещо відрізнялись за динамікою,

рівнем акумуляції та вивільненням Zn^{2+} у часову інтервалі. Загалом, для клітин РПЗ більш притамане накоплення Zn^{2+} , аніж для клітин ліній РМЗ. Проте, клітинам ліній, які вирізнялись характеристиками більшої злоякісності (MCF-7/Dox, DU-145, PC-3) притамано було акумулювати Zn^{2+} більш інтенсивно. Щодо дифузії Zn^{2+} з везикул у міжклітинне середовище, то у клітинах РПЗ цей процес досягає максимуму вже після 3 годин культивування, тоді як у клітинах РМЗ (MCF-7, MDA-MB-231) – переважно через 4-5 годин.

Враховуючи, що в результаті дії як хіміопрепаратів, так і наносистем ZnO відбувається індукція АФК, важливо було з'ясувати наявність змін даного параметра за умов дії досліджуваних компонентів. Найбільше зростання рівня АФК після впливу Д-ПАА/ZnO $H_2(SO_4^{2-})$ відмічено в клітинах ліній РПЗ – у 4,6-9,4 разів vs 2,5 -3,2 (клітини РМЗ) vs 0,26 - 0,4 (нормальні клітини), що пов'язано і з різним накопиченням Zn^{2+} даними клітинами. Результатом дії Д-ПАА/ZnO H_2/Dox є зменшення рівня АФК по відношенню до такого після впливу доксорубіцину на нормальні клітини та клітини ліній РПЗ, що дозволяє допустити зменшення цитотоксичних проявів даного препарату, тоді як для клітин ліній РМЗ, навпаки, було зафіксовано підвищення концентрації АФК після культивування з Д-ПАА/ZnO H_2/Dox .

Даний розділ також містить масив даних, які підтверджують загибель злоякісно трансформованих клітин шляхом апоптозу та некрозу, що супроводжується достовірним зростанням рівня експресії проапоптичних білків Вах, р53 та зниження експресії антиапоптичного білка Bcl-2. При дослідженні особливостей експресії деяких молекул адгезії (Е-кадгерину, N-кадгерину) було констатовано зростання рівня їх експресії (за винятком клітин MDA-MB-231), що може свідчити про послаблення процесів міграції та інвазії. Також показано, що наносистема Д-ПАА/ZnO $H_2(SO_4^{2-})$ опосередковує зміни в метаболічному статусі нормальних та злоякісно трансформованих клітин, результатом чого є достовірне зменшення вироблення лактату у всіх досліджених клітинах та зниження споживання глюкози, яке найбільш притамане було для клітин з характеристиками високої злоякісності (DU-145, PC-3 та MDA-MB-231).

Комплекс наукових досліджень, проведених в системі *in vitro*, дали підставу для подальшої роботи з вивчення дії наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ та у комбінації з доксорубіцином в системі *in vivo* на моделі карциносаркоми Уокер-256, результати якої висвітлено у **розділі 6**. Зокрема, автором представлені результати вивчення особливостей акумуляції Zn^{2+} у пухлинній тканині та тканинах життєво важливих органів щурів (печінці, нирках, селезінці) з карциносаркомою Уокер-256, що зазнали внутрішньовенного введення Д-ПАА/ZnO НЧ та у комбінації з доксорубіцином, які свідчать про зростання накопичення Zn^{2+} у тканині карциносаркоми Уокер 256 при застосуванні Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox аніж Д-ПАА/ZnO НЧ на 14%, що є достовірно вище порівняно із введенням доксорубіцину у монорежимі. Акумуляція Zn^{2+} у печінці, нирках та селезінці відбувалась менш інтенсивно, аніж в пухлинній тканині при введенні Д-ПАА/ZnO НЧ/Dox та Д-ПАА/ZnO НЧ, а токсикологічні прояви їх дії на органи були менш виражені відносно впливу доксорубіцина. Отримані дані свідчать, що створена наносистема ПАА/ZnO НЧ/Dox дозволяє селективно знизити цитотоксичні ефекти доксорубіцину на нормальні клітини організму і посилити їх щодо пухлинних клітин.

Обговорення та узагальнення отриманих результатів проведено добре, шляхом послідовного аналізу результатів своєї роботи, пояснення щодо виявлених нових фактів з урахуванням сучасних даних літератури, обґрунтовують переваги отриманого наноконструкту перед раніше відомими, що доводить перспективність його застосування в роботі науковців.

Висновки, які логічно випливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і ясно, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Академічна доброчесність.

Станом на 03.05.2024 року унікальність даної роботи становить 98,9%, що підтверджено експертним висновком про перевірку на наявність академічного плагіату, затвердженого директором Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України д.б.н., проф. Л.Г.

Бучинською. У разі звернень до результатів та тексту інших авторів у дисертаційній роботі наведенні посилання.

Зауваження щодо оформлення та змісту дисертації, запитання до здобувача.

В загальному робота складає гарне враження, логічно викладені результати дослідження, отримані на високому методологічному рівні, які супроводжуються якісним ілюстративним матеріалом. Попри це є незначні **зауваження**, що стосуються наступного:

1. Враховуючи зміст підрозділу 1.6.4, його слід би назвати «Можливі системи стабілізації та цільової доставки ZnO НЧ».

2. У підрозділі 2.1.1. представлена характеристики клітинних ліній, проте доречно дати посилання на першоджерела щодо їх походження.

3. У примітках таблиці 4.2, рис.5.3, 5.6, 5.10 потрібно вказати по відношенню до якого показника визначали значення рівня статистичної значущості **p**.

4. Для переконливості описаних результатів роботи, представлених на рис. 5.18 - Вміст фосфатидилсерину у лініях клітин 3T3 A31 та МАЕС після інкубації Д-ПАА/ZnO НЧ, доречно було б надати статистичну обробку результатів за показником mean FITC.

5. Рисунки 5.18-5.20 необхідно супроводжувати представленням загальної популяції клітин за параметрами прямого та бічного світлорозсіювання.

6. У підрозділі 5.3 клітини, які знаходяться у стані раннього апоптозу, автор помилково оцінює як у некрозі.

7. У висновку 2 бажано вказати зміни показника EC50 наносистеми Д-ПАА/ZnO НЧ з доксорубіцином для клітин ліній РМЗ і РПЗ не лише по відношенню до Д-ПАА/ZnO НЧ, але і до препарату.

8. По тексту зустрічаються описки, неточності, лексичні помилки («залежно від типу та стадії клінічного процесу» (с.32), «лікування цинком» (с.35), «інгібування росту», тоді як мова йде про загибель клітин (с.74, 78)).

Окрім зауважень, в ході рецензування роботи виникли **запитання**:

1. При яких захворювання є доцільним використання наночастинок цинку окрім гормонозалежних злоякісних новоутворень?

2. Чому при створенні наносистеми з ZnO НЧ був використаний декстран-ко-поліакриламід? Наскільки вартісним та трудомістким є процес отримання досліджуваних вами нанокомпозитів?

3. Наскільки стабільною є отримана вами наносистема Д-ПАА/ZnO НЧ, як ви це досліджували і які умови її зберігання? Як швидко утворюються агрегати ZnO НЧ?

4. Як ви визначали вид загибелі клітин – апоптоз або некроз, при застосуванні метода проточної цитометрії?

Зазначенні зауваження, які виникли в процесі рецензування роботи, не зменшують загальну позитивну оцінку роботи та її наукову цінність.

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 самостійним, завершеним науковим дослідженням, результати якого спрямовані на вирішення актуальної задачі онкології – розробки ефективної системи з наночастинками оксиду цинку, яка окрім протипухлинної активності здатна інгібувати цитотокічні ефекти доксорубіцину. Актуальність теми, новизна дослідження, теоретичне і практичне значення отриманих результатів, а також сучасний методичний рівень проведених досліджень, свідчать про високі наукові досягнення здобувача, а дисертаційне дослідження повністю 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.). Тому вважаю, що здобувач заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 - Біологія.

Офіційний рецензент:

кандидат біол. наук, с.н.с.,
старший науковий співробітник
відділу генетики раку та онкогематології
ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Лариса ШЛАПАЦЬКА