



ВІДЗИВ
офіційного опонента
на дисертаційну роботу **Кобилінської Лесі Іванівни**
«Біохімічні механізми протипухлинної дії похідних
4-тіазолідинону за їхньої доставки у клітини нанорозмірним
полімерним носієм»
на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00. 04- біохімія

Проблема подолання ракових захворювань, на жаль, залишається однією з найактуальніших у світі і потребує нових та оптимізації традиційних підходів до її вирішення. Серед хіміотерапевтичних підходів можна виокремити ті, що їх вважають найбільш перспективними. По-перше, це застосування традиційних протипухлинних препаратів, але за їх нового технологічного формулювання, тобто у складі ковалентних, або нековалентних комплексів з наноносіями різної природи – ліпосомами, полімерними міцелами, вуглецевими або металевими наночастинками. Такий підхід спрямований на поліпшення стабільності, біодоступності, таргетності доставки, зниження побічних токсичних ефектів, та, зрештою, на підвищення ефективності дії препарату. Інший підхід – розробка нових альтернативних ефективних хіміопрепаратів, що потребує попереднього скринінгу потенційних мішеней дії хімічної субстанції, її синтезу та пошуку ефективних дериватів, а також дослідження як їх протипухлинної ефективності, так і можливих токсичних ефектів на організм. Представлена до захисту дисертаційна робота Л.І. Кобилінської, без сумніву, є актуальною, оскільки поєднує обидва підходи – з'ясування механізмів дії та протипухлинної ефективності новосинтезованих похідних 4-тіазолідинону як у вільному стані, так і у комплексі з нанорозмірним полімерним носієм на основі поліетиленгліколю.

Роботу виконано згідно наукової тематики кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, договору про наукову співпрацю з Інститутом фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Інститутом біології клітини НАН України, Інститутом біології тварин НААН України та за грантами Програми міжнародних досліджень та інновацій у медицині Медичного

центру Синайський Кедр (Лос-Анжелес, США) та Асоціації регіональної співпраці в галузі здоров'я, науки і технологій RECOOP-HST (Будапешт, Угорщина).

У літературному огляді, що складається з 5-ти розділів, автор аналізує дані щодо біохімічних механізмів дії протипухлинних препаратів (Підрозділ 1.1), подає структуру та фізико-хімічну характеристику похідних 4-тіазолідинону (Підрозділ 1.2), характеризує механізми гепато-, кардіо- та нефротоксичної дії хіміотерапевтичних протипухлинних препаратів (Підрозділ 1.3), висвітлює роль вільнорадикальних метаболітів та системи антиоксидантного захисту у проявах цитотоксичної дії протипухлинних препаратів (Підрозділ 1.4) та аналізує переваги використання наноматеріалів для підвищення ефективності доставки та дії протипухлинних лікарських засобів (Підрозділ 1.5). Список використаних джерел налічує 545 посилань, серед яких переважна більшість припадає на роботи останніх п'яти років.

Свідченням достовірності отриманих у роботі даних та обґрунтованості зроблених висновків є широкий спектр використаних сучасних методичних прийомів, серед яких варто зазначити основні. Це біохімічні (електрофорез протеїнів, Вестерн-блот аналіз, високоефективної рідинна хроматографія/тандемна мас-спектрометрія, оцінка ензиматичної активності та вмісту маркерних метаболітів), фізико-хімічні (створення комплексів протипухлинних речовин з полімерним носієм, спектральні вимірювання), цитологічні (культивування клітин, протокова цитофлуориметрія, оцінка ДНК-комет, оцінка морфологічного стану клітин), токсикологічні методи (визначення ЛД₅₀, біорозподілу та кумуляції препаратів, інших фармакокінетичних параметрів), а також методи експериментальної онкології (тваринна модель пухлинного росту, оцінка виживання мишей-пухлинносіїв), комп'ютерного моделювання, статистичного аналізу. Для скринінгу антиканцерогенної активності досліджуваних сполук використано 60 ліній злоякісних клітин різного походження.

У роботі використано похідні 4-тіазолідинону з різними замісниками у складі фенольної, тіазольної, або індольної груп та полімерний носій (ПН) – полі(2-трет-бутилперокси -2-метил -5-гексен-3-ін)-гліцидилметакрилат)-графт-поліетиленгліколь (полі(ВЕР-ГМА)-графт-ПЕГ ПН), синтезовані на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського Національного медичного університету імені Данила Галицького. Як позитивні контролю використано комерційні протипухлинні препарати «Доксорубіцин» та «Темозоломід».

Результати наукового дослідження викладено у 7-ми розділах, ілюстровано 65-ма рисунками та 20-ма таблицями. Об'єм рукопису складає 329 сторінок.

У Розділі 3.1. огляду літератури наведено дані фізико-хімічного дослідження розчинів синтетичних похідних 4-тіазолідинону, оцінено спектри їх поглинання та люмінесценції, токсичну дію сполук на злоякісні клітини 60-ти різних ліній та відібрано похідні Les-3288, Les-3833, Les-3882 як перспективні для подальших досліджень. Показано, що похідне Les-3833 найефективніше пригнічує клітини лінії SF-539 пухлини ЦНС людини та методом молекулярного докінгу продемонстровано високу ймовірність взаємодії цього похідного з CheckPoint кіназою1, мітоген-активованою протеїнкіназою, каспазою-6 та каспазою-8.

Розділ 3.2. присвячено порівняльному аналізу токсичної дії похідних 4-тіазолідинону Les-3288, Les-3833, Les-3882 та препаратів, що використовуються у клінічній практиці доксорубіцину і темозоломіду на клітини С6 гліоми щура і U251 гліоми людини. За дії похідних 4-тіазолідинону у діапазоні концентрацій до 1мкг/мл виявлено таке ранжування токсичності: Les-3882 < Les-3833 < доксорубіцин < Les-3288. Отримано низку доказів того, що токсична дія досліджуваних сполук реалізується через індукцію апоптозу. Так, за 24 годинної дії у концентрації 0.1 мкг/мл сполука Les-3288 спричиняла 22-кратне збільшення кількості преапоптичних клітин у фазі sub-G1 клітинного циклу, тоді як доксорубіцин – лише 5-кратне. Вищий проапоптичний ефект Les-3288 порівняно з доксорубіцином у еквівалентній дозі (1мкг/мл) підтверджено FACS аналізом, а також Вестерн-блот аналізом, який показав, що Les-3288, на відміну від доксорубіцину, знижує експресію залученої до злоякісної трансформації та до пригнічення апоптозу ERK1/2 кінази у клітинах U251 гліоми людини.

Для того, щоб дослідити переваги і перспективність використання у протипухлинній терапії похідних 4 –тіазолідинону у вільній формі та у формі комплексу з полімерним носієм автором здійснено детальне і ґрунтовне *in vivo* дослідження гострої токсичності, біорозподілу, виведення з організму цих сполук, а також їх впливу на метаболічні показники стану печінки, серця, нирки та крові, що є важливим здобутком дисертаційної роботи.

Встановлено, що на відміну від доксорубіцину, який має високу ступінь кумуляції та належить до 2-го класу сильно токсичних речовин, сполуки Les-3288 та -3882 характеризуються слабкою кумуляцією та належать до 3-го класу помірно

токсичних речовин з LD_{50} порядку 200 мг/кг, що у 4 рази нижче, ніж для доксорубіцину. Значення LD_{50} для сполуки Les-3833 виявилось у 2 рази нижчим від такого для доксорубіцину. Показано, що як полімерний носій, так і його комплекси з Les- 3288, -3833, -3882 належить до 4-го класу малотоксичних речовин.

З використанням високоефективної рідинної хроматографії/тандемної мас-спектрометрії оцінено біорозподіл похідних 4-тіазолідинону на прикладі Les-3833 та встановлено, що сполука швидко (упродовж 15хв) засвоюється з крові тканинами, упродовж 24 год метаболізується у печінці на виводиться через нирки. Показано, що полімерний носій розщеплюється у печінці на складові, які виводяться з сечею.

Розділ 3.5 присвячено оцінці біохімічних показників токсичної дії сполук Les-3288, Les-3833, Les-3882 та їхніх комплексів із полімерним наноносієм у сироватці крові та гомогенатах печінки, серця і нирки після щоденного введення тваринам досліджуваних сполук упродовж 10-20 днів. Виявлено зростання активності аспаргатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, креатинфосфокінази, лактатдегідрогенази, лужної фосфатази, α -амілази і γ -глутамілтрансферази, а також концентрації сечовини, креатиніну, загального білка, катіонів натрію і аніонів хлориду у сироватці крові лабораторних щурів, тоді як за використання комплексів досліджуваних сполук з полімерним носієм ці показники нормалізувались, що свідчить про зниження кардіо-, гепато- і нефротоксичної дії цих сполук порівняно з їхньою дією у вільному стані.

У розділі 3.6. досліджено механізми дії Les -3288 та -3833 у комплексі з полімерним наноносієм на клітини С6 гліоми щура. Встановлено, що у разі застосування цих сполук у комплексі з ПН вдається за їх низької 0,1 мкг/мл концентрації вже через 24 год інкубації, тобто за умов, коли сполуки у вільному стані не діяли, досягти суттєвого зниження виживаності злоякісних клітин. Показано, що посилення токсичного ефекту Les-3833 внаслідок його комплексування з ПН пов'язаний зі збільшенням вмісту апоптичних клітин у популяції. Окрім того, з використанням методу ДНК комет виявлено, що у ранній період (3год) дії Les -3833 має місце підвищення вмісту фрагментованої ДНК у хвості, яке ставало значнішим у разі дії комплексу з ПН. За подовження терміну інкубації проявлявся ушкоджувальний вплив обох похідних на ДНК, проте комплектація з ПН призводила до зворотного ефекту – послаблення ушкодження ДНК.

Важливими є дані, представлені автором у Розділі 3.7 щодо протипухлинної дії досліджуваних сполук *in vivo* на моделі прищепленої лімфоми NK/Ly. Встановлено, що сполуки Les-3833, -3288 та доксорубіцин з однаковою ефективністю зменшували об'єм асцитної рідини як показник розвитку лімфоми, хоча виживаність тварин за дії доксорубіцину була вищою, ніж за дії похідних 4-тіазолідинону. Проте за введення Les-3833 у вигляді комплексу з ПН вдалося подовжити життєздатність тварин – якщо за введення Les-3833 у вільній формі миші-пухлиноносії гинули повністю на 35-й день експерименту, то за введення комплексу 20% тварин у цей термін виживали. Окрім того, за дії Les-3833 у комплексі з ПН біохімічні показники токсичності у сироватці мишей-пухлиноносіїв були нижчими, ніж за дії Les -3833 у вільному стані

Експериментальні результати роботи мають важливе практичне значення, оскільки доводять ефективність комплексування хіміотерапевтичних протипухлинних препаратів з полімерним носієм на основі поліетиленгліколю для посилення їх біологічної дії та зниження негативних побічних ефектів в організмі. На основі даних роботи отримано Патент України на корисну модель та прийнято заявку на Патент України на винахід.

До роботи виникають деякі зауваження та питання, відповіді на які сприятимуть глибшому розумінню отриманих автором даних.

1. Чи коректно вважати комплекси похідних 4-тіазолідинону з полімерним носієм водорозчинними, чи все ж отримано їх водну дисперсію?

2. У обговоренні результатів часто використовується термін «доставка» (таргетність дії) досліджуваних препаратів. Проте не наведено даних щодо того, що полімерний носій дійсно забезпечує чи прискорює потрапляння похідних у внутрішньоклітинний простір злоякісних клітин.

3. У експериментах *in vitro* дію похідних досліджували у діапазоні 0.1-1мкг/мл. Якщо комплекси похідних з полімерним носієм створювали за співвідношення компонентів 1:30, то слід було перевірити ефекти ПН у відповідних коненцтраціях, а не лише у концентрації 1мкг/мл. Дані про те, що у разі комплексування Les-3833 з ПН послаблюється ушкоджу вальна дія Les-3833 на ДНК, а також щодо позитивного впливу ПН на виживання мишей-пухлиноносіїв вказують на існування ефектів самого ПН.

4. У роботі показано, що сполука Les-3833 майже не потрапляє до мозку тварин і зроблено висновок, що вона не долає гематоенцефалічний бар'єр. Тоді чому для дослідження її протипухлинних ефектів обрано клітини гліоми?

5. У висновку 9 вказано, зокрема, що сполуки Les-3288 та -3882 індукують оксидативний стрес і одночасно вказано на їх здатність поглинати вільнорадикальні сполуки. Насправді ж вміст супероксидного та гідроксильного радикалів у сироватці крові за дії сполук -3288 та 3882 знижується, а зростає лише за дії Les-3833 (Рис.3.5.3 та 3.5.4), з чим, можливо, і пов'язана вища протипухлинна ефективність цієї сполуки.

6. Бажано більшою мірою узагальнити отримані дані у плані порівняння між собою та з золотими стандартами хіміотерапії трьох обраних для дослідження похідних та їх комплексів з ПН (з точки зору як їх протипухлинної дії, так і побічних ефектів).

Ці зауваження не знижують високий науковий рівень представленої роботи та не є підставою для заперечення її високої оцінки. Аналіз дисертації ««Біохімічні механізми протипухлинної дії похідних 4-тіазолідинону за їхньої доставки у клітини нанорозмірним полімерним носієм» свідчить, що це самостійне, завершене наукове дослідження, яке за актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, обсягом отриманих даних, теоретичною і практичною значимістю, адекватністю проведеного в роботі аналізу і відповідністю зроблених висновків відповідає вимогам МОН України до докторських дисертацій п.п. 9, 10, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету міністрів України №567 від 24.07.2013р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету міністрів України №656 від 19.08.2015р., №1159 від 30.12.2015 р., №567 від 27.07.2016р.), а її автор Кобилінська Л.І. заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Доктор біологічних наук,
професор, провідний науковий співробітник
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ

Матишевська О.П.

