

ВІДГУК
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Прилуцької Світлани Володимирівни
“Розробка технології посилення протипухлинної активності цисплатину
за використання C₆₀ фулерену”,
представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія

Актуальність теми. Розвиток нанобіотехнологічних досліджень на сьогоднішній день набуває великих масштабів, зокрема і в біомедичній галузі. Особливий інтерес у дослідників викликають наноматеріали, які є нетоксичним і можуть бути використані для таргетної доставки лікарських препаратів. Серед синтезованих наночастинок одним з перспективних є представник наноструктур карбону C₆₀ фулерен, який потенційно міг бути використаний для підвищення ефективності ряду протипухлинних препаратів. Відомо, що клінічне застосування, наприклад, цисплатину - протипухлинного препарату широкої дії, є обмеженим через його низьку селективність. Також встановлено, що за його використання розвивається медикаментозна резистентність та спостерігається токсичний вплив на нормальні клітини і тканини. Враховуючи біосумісність та унікальні фізико-хімічні властивості фулерену, він міг бути розглянутий та детально вивчений як ефективний модифікатор дії саме цього протипухлинного препарату. Отже, з огляду на зазначене, актуальність теми дисертації Прилуцької С.В., яка присвячена розробці нанобіотехнологічних підходів для підвищення ефективності протипухлинної дії цисплатину за використання C₆₀ фулерену, не викликає сумнівів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Прилуцької Світлани Володимирівни виконана в рамках науково-дослідних тем Київського національного університету імені Тараса Шевченка: “Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умови розвитку різних патологій” (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.), “Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів” (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.), “Кристалохімічний дизайн і функціональні властивості нових складнооксидних сполук та гіbridних наноструктур на їх основі” (№ д/р 0119U100316, 2019-2021 рр.), а також частково підтримана українсько-німецьким білатеральним грантом BMBF (ФРН) (№ Ukr 10-012, 2010-2012 рр.), персональними грантами DFG (ФРН) (2010 р.) та МОН України (2012 р.) для молодих вчених, DAAD стипендіями (ФРН) (2010, 2014, 2019 рр.), вітчизняним грантом НАН України “Нові нановуглецеві матеріали для спрямованої дії на онкотрансформовані клітини” (№ д/р 0110U005962, 2010-2014 рр.) в рамках програми “Нанотехнології та наноматеріали” та міжнародним дослідницьким проектом УНТЦ «Нові функціональні наноматеріали для підвищення ефективності хіміотерапії» (№ 6256, 2017-2019 рр.).



Слід відмітити, що дисертаційна робота Прилуцької С.В. є добре структурованою, написана гарною мовою, її мета і завдання чітко визначені та добре співставлені з отриманими результатами та сформульованими висновками. Робота містить всі необхідні розділи і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 8-ми розділів, присвячених викладенню результатів власних досліджень та їх обговоренню, узагальнення отриманих результатів дослідження (Розділ 11), висновків, списку використаних джерел літератури (545 посилань). Дисертаційну роботу викладено на 336 сторінках та проілюстровано 65 рисунками та 20 таблицями.

Огляд літератури логічно побудований і являє собою достатній аналіз результатів досліджень, які були проведені іншими авторами за напрямком дисертаційної роботи. Так, в Розділі 1 проаналізовано накопичені знання щодо зложісної трансформації клітин та розвитку резистентності до хіміопрепаратів; надано характеристику цисплатину; описано його структуру, властивості та протипухлинну дію; застосування цисплатину в хіміотерапії та його побічні ефекти; шляхи надходження цього препарату у клітину та механізми дії; механізми розвитку резистентності зложісних клітин до цисплатину; використання біосумісних нанорозмірних носіїв для спрямованої доставки протипухлинних препаратів. Також в цьому Розділі детально описано про C_{60} фулерени як новий клас біологічно-активних карбонових наноструктур; про структуру, властивості, біодоступність C_{60} фулерену, його біорозподіл в організмі тварин, внутрішньоклітинну локалізацію та біологічну активність, а також протипухлинну активність C_{60} фулерену за комбінованої дії з хіміопрепаратами.

Огляд свідчить про грунтовні знання автором сучасного стану в обраній галузі досліджень, критичне відношення до опублікованих результатів, здатність виокремлювати та узагальнювати головне з великої кількості посилань на актуальні роботи у даній галузі за останні роки, чітко викласти стан та перспективи власних досліджень.

У другому розділі роботи наведено відомості про матеріали і методи дослідження, які були використані Прилуцькою Свіланою Володимирівною у дисертаційній роботі. Зокрема, це методи клітинної біології (культивування, фарбування клітин, протокова цитофлуориметрія, світлова, фазово-контрастна, конфокальна і флуоресцентна мікроскопія) та гістології; спектрофотометричний та спектрофлуориметричний методи; методи токсикології (визначення напівлетальної дози LD_{50} , морфофункціональний стан клітин кровотворної системи); методи експериментальної онкології (показники пухлинного росту, метастазування, виживаності мишей-пухлиноносіїв); динамічне розсіювання світла; сканувальна тунельна мікроскопія; методи комп’ютерного моделювання та статистична обробка результатів дослідження.

Розділи 3-10 присвячені викладенню результатів експериментальних досліджень автора та їх аналізу. Так, у Розділі 3 «Мембронотропні властивості C_{60} фулерену» Прилуцька С.В. наводить результати власних досліджень щодо вивчення особливостей проникнення міченого C_{60} фулерену

через плазматичну мемрану та його внутрішньоклітинну локалізацію. Зокрема, нею було встановлено, що C_{60} фулерен може не лише вбудовуватись у ліпідний матрикс штучних мембран, але й проникати крізь клітинну мемрану та локалізуватися всередині клітин, зокрема у мітохондріях, як це було продемонстровано на клітинах CCRF-CEM гострої лімфобластної лейкемії людини.

У Розділі 4 наведено результати досліджень біологічної активності C_{60} фулерену на клітинному рівні та продемонстровано, що C_{60} фулерен за концентрацій 5 та 10 мкМ не спричинє токсичних ефектів щодо нормальніх клітин, а при підвищенні його концентрації до 20 мкМ виявляє токсичну дії щодо злойкісно трансформованих клітин. Також встановлено, що C_{60} фулерен у концентрації 10 мкМ не впливає на супероксиддисмутазну, глутатіонпероксидазну та глутатіонтрансферазну активність тимоцитів, однак спричиняє зміни у активності компонентів АОС клітин лейкемії. За дії 10 мкМ C_{60} фулерену відбувається зниження показника адгезії клітин MCF-7 до субстрату, а також змінюється розподіл клітин за фазами клітинного циклу, зокрема, було встановлено, що на початкових термінах інкубації збільшується кількість клітин у S-фазі, тоді як у подальшому спостерігається затримка клітин у фазі G2/M.

У Розділі 5, присвяченому вивченю цитотоксичної активності цисплатину щодо злойкісно трансформованих клітин різного гістогенезу та чутливості до цитостатиків, дисертація приходить до висновку, що цисплатин дозозалежно знижує виживаність злойкісно трансформованих клітин різного гістогенезу, зокрема, цей ефект нею було встановлено на клітинах HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії людини, клітинах НСТ-116 колоректальної карциноми людини, клітинах HeLa і KB-3-1 карциноми шийки матки людини та клітинах LLC карциноми легені Льюїс миші. Також нею показано, що надекспресія деяких білків-транспортерів (Р-глікопротеїну та MRP1) у клітин, резистентних до вінкристину та адріаміцину, спричиняє розвиток резистентності до дії цисплатину, тоді як надекспресія Р-глікопротеїну у клітин, резистентних до колхіцину, знижує їх резистентність до дії даного препарату порівняно з клітинами дикого типу.

У Розділі 6 наведено результати по моделюванню взаємодії C_{60} фулерену з ABC-транспортерами за використання методів *in silico*, та встановлено, що C_{60} фулерен безпосередньо взаємодіє з трьома основними білками-транспортерами, які беруть участь у процесах резистентності пухлинних клітин до лікарських препаратів, а саме Р-глікопротеїном, MRP-1 і MRP-2, що узгоджується з опублікованим даними інших дослідників.

У Розділі 7 наведено дані щодо вивчення комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину на чутливі та резистентні до цитостатику клітини L1210 л лімфоцитарної лейкемії миші. Зокрема, автором встановлено, що за комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та цисплатину, використаних у досліджуваних концентраціях, токсичний ефект цитостатика у чутливих клітинах L1210 посилювався, а у резистентних клітинах L1210/Cis-Pt – відновлювався. Дисертація робить висновок, що механізмами токсичної комбінованої дії фотозбудженого C_{60} фулерену та

цисплатину на лейкемічні клітини L1210 є посилення продуктування АФК, підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} , падіння мітохондріального потенціалу та індукція загибелі клітин за механізмом апоптозу.

Ще одним підходом до посилення дії протипухлинних препаратів є створення їх ковалентних та нековалентних комплексів з C_{60} фулереном. Саме це питання було вирішено автором під час проведення власних досліджень і описано у Розділі 8. Зокрема, С.В. Прилуцькою вперше було створено нековалентний, стабільний у водному середовищі нанокомплекс C_{60} фулерену з Cis-Pt ($\text{C}_{60}\text{-Cis-Pt}$) та охарактеризовано його. Комплексоутворення між поодинокими молекулами C_{60} та Cis-Pt було підтверджено методами комп'ютерного моделювання, сканувальної тунельної мікроскопії та динамічного розсіювання світла.

Розділи 9 і 10 присвячені викладенню автором власних результатів щодо вивчення біологічних ефектів $\text{C}_{60}\text{-Cis-Pt}$ нанокомплексу в системі *in vitro* та *in vivo*. Дисертантою доведено ефективнішу протипухлинну дію $\text{C}_{60}\text{-Cis-Pt}$ нанокомплексу щодо карциноми легені Льюїс порівняно з дією вільного Cis-Pt за еквівалентної дози. В експериментах *in vitro* встановлено, що токсичність $\text{C}_{60}\text{-Cis-Pt}$ нанокомплексу євищою порівняно з окремою дією цисплатину і реалізується через індукцію апоптозу. Вперше оцінено гостру токсичність немодифікованого C_{60} фулерену та $\text{C}_{60}\text{-Cis-Pt}$ нанокомплексу за внутрішньочеревного введення мишам.

За результатами проведених експериментів *in vivo*, як зазначено Прилуцькою С.В. в дисертаційній роботі, встановлено, що токсичність Cis-Pt за комплексоутворення із C_{60} фулереном знижується удвічі. Також показано, що $\text{C}_{60}\text{-Cis-Pt}$ нанокомплекс ефективніше пригнічує ріст перешепленої карциноми легені Льюїс та утворення метастазів у легенях мишей порівняно з дією Cis-Pt за еквівалентної дози, що супроводжується подовженням тривалості життя експериментальних мишей, нормалізацією їх маси тіла та показників крові. Отже, отримані результати свідчать про перспективність використання C_{60} фулерену як фотосенсибілізатора у фотодинамічній протипухлинній терапії, а також як таргетного носія протипухлинних препаратів, зокрема цисплатину.

Ключовим у дисертаційній роботі є Розділ 11 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження», де автор піддає детальному та критичному аналізу результати власних досліджень, аналізує їх із загально клітинно-біологічних та біотехнологічних точок зору із зачлененням даних літератури, висловлює власні припущення, що мають важливе наукове значення і роблять певний внесок у подальше практичне застосування отриманих результатів.

Ступінь обґрутованості і достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх новизна. Одержані автором результати містять наукову новизну, яка полягає у тому, що вперше проведено комплексне дослідження, отримано оригінальні дані та розроблено технологію застосування C_{60} фулерену для підвищення протипухлинної ефективності цисплатину у системах *in vitro* та *in vivo* на модельних об'єктах.

Зокрема, С.В. Прилуцькою вперше застосовано технології використання немодифікованого C₆₀ фулерену як у комбінації з цисплатином після фотоактивації наноструктури, так і у складі нековалентного нанокомплексу з цисплатином (C₆₀-Cis-Pt) для підвищення ефективності дії традиційного протипухлинного препарату за низьких доз та доведено їх ефективність.

Встановлено, що C₆₀ фулерен запобігає спричиненому як пероксидом водню, так і цисплатином продукуванню АФК тимоцитами, H₂O₂-індукованому зниженню життєздатності тимоцитів та Cis-Pt-індукованому гемолізу еритроцитів. Доведено, що C₆₀ фулерен поглинається лейкемічними клітинами та локалізується переважно у мітохондріях. Вперше створено нековалентний, стабільний у водному середовищі нанокомплекс C₆₀ фулерену із Cis-Pt (C₆₀-Cis-Pt) та охарактеризовано його структуру. Доведено ефективнішу протипухлинну дію C₆₀-Cis-Pt нанокомплексу щодо карциноми легені Льюїс.

Вперше оцінено гостру токсичність немодифікованого C₆₀ фулерену та C₆₀-Cis-Pt нанокомплексу на миших. Вперше в експериментах *in vivo* встановлено, що токсичність Cis-Pt за комплексоутворення із C₆₀ фулереном знижується удвічі. Показано, що C₆₀-Cis-Pt нанокомплекс ефективніше пригнічує ріст перешепленої карциноми легені Льюїс та утворення метастазів у легенях мишів. Сформульовані основні наукові положення та висновки автором ґрунтуються на використанні адекватних щодо поставлених завдань методів. Висновки роботи достатньо чітко сформульовані і логічно випливають з аналізу отриманих експериментальних даних.

За темою дисертації автором опубліковано 79 наукових робіт, зокрема 31 стаття у фахових виданнях, з них 23 включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, 2 розділи у монографіях, 2 патенти України на винахід, а також 44 тези доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів і з'їздів.

У той же під час ознайомлення з дисертаційною роботою у мене додатково виникли наступні запитання, на які хотілось би отримати відповіді:

1) Відомо, що клітинна загибел, індукована цисплатином, ґрунтуються на утворенні ДНК-аддуктів і його цитотоксичність опосередковується активацією нисхідних сигнальних шляхів, що призводить до апоптозу. Які механізми клітинної загибелі опосередковують цитотоксичну протипухлинну дію нанокомплексу C₆₀ фулерену з цисплатином?

2) Які показники свідчать про стабільність нанокомплексу C₆₀ фулерену з цисплатином?

3) Ви провели комплексні дослідження протипухлинної активності цисплатину за комбінованої дії із фотозбудженим C₆₀ фулереном та за нековалентного комплексоутворення із C₆₀ фулереном. Чи є перспективним застосування інших відомих хіміопрепаратів у комбінації із C₆₀ фулереном?

Не зважаючи на поставлені до автора запитання, хочу зазначити, що дисертація в цілому є завершеним актуальним самостійним дослідженням,

що виконане на високому науковому рівні із залученням найсучасніших методів досліджень, характеризується новизною одержаних експериментальних даних, достовірністю та новизною висновків. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстративним матеріалом дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки. Автореферат дисертації достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації.

Отже, дисертаційна робота Прилуцької Світлани Володимирівни **"Розробка технології посилення протипухлиної активності цисплатину за використання C₆₀ фулерену"** є закінченою науковою працею, виконаною на високому теоретичному та методологічному рівнях, яка за своїм змістом, важливістю отриманих результатів та оформленню відповідає вимогам п.п. 9, 10, 12,13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету міністрів України №567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету міністрів України №656 від 19.08.2015р., №1159 від 30.12.2015р. та №567 від 27.07.2016р.)", а її автор повністю заслуговує на присудження їх наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія

Завідувач відділу клітинної біології
та біотехнології
ДУ «Інституту харчової біотехнології та
геноміки НАН України»,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор

А.І. Ємець

Підпис чл.-кор. НАН України А.І.Ємець засвідчує:
Вчений секретар Інституту,
к.б.н., с.н.с.



Я.В. Пірко