

8 - Жовт 2020

Бх. № 102/03-07/МСР

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Прилуцької Світлани Володимирівни
«Розробка технології посилення протипухлинної активності цисплатину
за використання C_{60} фуллерену» представленої на здобуття наукового
ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 -
біотехнологія

Актуальність роботи.

Відомо, що одне з провідних місць серед існуючих методів лікування онкологічних хворих займає хімітерапія, яку застосовують як самостійний метод або як компонент комплексного лікування в неoad'юvantному та в ад'юvantному режимах. Водночас, призначення протипухлинних засобів пов'язане з низкою суттєвих проблем. Одна з них полягає у неспецифічності дії цитостатиків та високій токсичності щодо органів і тканин, не уражених пухлиною, зокрема, кардіо-, нефро- та нейротоксичності.

Останнім часом значна увага приділяється нестандартним підходам до підвищення ефективності офіцинальних протипухлинних препаратів, а саме, створенню різноманітних нанотехнологічних платформ з використанням сучасних методів біотехнологій. Встановлено, що завдяки своїм властивостям, нанорозмірні матеріали різного фізико-хімічного походження здатні здійснювати міжклітинний та внутрішньоклітинний транспорт цитостатиків, контролюване вивільнення субстанцій з лікарської форми, доставку лікарського засобу до біомішені. Одним з перспективних наноматеріалів для практичного використання у біології і медицині на сьогодні вважається карбонова наноструктура C_{60} фуллерен. Нанорозмірність (0,72 нм), майже сферична форма, гідрофобність, біосумісність та біодоступність забезпечують взаємодію молекул C_{60} з клітинними структурами та проникнення всередину клітин. Наявність на поверхні молекули C_{60} π-кон'югованої системи подвійних зв'язків між гекса- та пентагональними структурами зумовлює здатність вловлювати вільні радикали і у незбудженному стані виявляти антиоксидантні властивості, а за умови фотоактивації в УФ-видимому діапазоні з високою ефективністю продукувати активні форми кисню (АФК). Крім того, поверхня молекули C_{60} легко піддається фізико-хімічній

модифікації, в тому числі протипухлинними препаратами, що дозволяє застосовувати наноструктуру для біомедичних цілей. Враховуючи зазначене, актуальність дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

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

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

Наукова новизна одержаних результатів.

Експериментально доведено ефективність та обґрунтовано доцільність використання C_{60} фулерену для підвищення цитостатичної активності цисплатину. В системі *in vitro* досліджено особливості накопичення та локалізацію фулерену C_{60} у клітинах лімфоцитарної лейкемії миші та з'ясовано механізми апоптичної загибелі чутливих та резистентних клітин під впливом фотозбудженого фулерену та цисплатину. Створено нанокомплекс C_{60} фулерену із цисплатином, доведено його стабільність у водному середовищі та охарактеризовано його структуру.

На підставі експериментальних і розрахункових даних встановлено, що створений C₆₀-Cis-Pt нанокомплекс володіє меншою токсичністю у порівнянні з офіцинальною формою цитостатика, що вказує на перспективність його подальшого поглибленого вивчення.

В системах *in vitro* та *in vivo* доведено, що C₆₀-Cis-Pt нанокомплекс, порівняно з цисплатином, має більший цитотоксичний та терапевтичний ефект при дії на клітини LLC та карциноми легені Льюїс.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані фундаментальні дані розширяють існуючі уявлення про механізми впливу C₆₀ фулерену на нормальні та злоякісно трансформовані клітини. Розроблені технологічні підходи можуть бути використані в експериментальних дослідженнях для підвищення вибірковості дії цисплатину та подолання медикаментозної резистентності. Антиоксидантні властивості C₆₀ фулерену можуть бути використані для запобігання побічних ефектів, спричинених як запальними/пухлинними процесами в організмі, так і токсичною дією протипухлинних препаратів. Прооксидантні властивості молекули C₆₀ свідчать про перспективність застосування наноструктури як фотосенсибілізатора у фотодинамічній терапії раку.

Результати проведеного дослідження можуть бути використані у матеріалах лекцій при викладанні дисциплін «Біотехнологія» та «Основи нанобіотехнологій», а також при проведенні лабораторних робіт та навчальних практик для студентів зі спеціальностей «біохімія», «біофізика», «медична хімія», «молекулярна біологія» та «біотехнологія».

Особистий внесок здобувача.

Дисертанткою сформульовано завдання дослідження, здійснено пошук та аналіз наукової літератури за темою дисертації, вибір об'єктів та методів дослідження, постановка експериментів. Авторка розробила методики фотозбудження C₆₀ фулерену та створення нанокомплексів C₆₀ фулерену з протипухлинними препаратами у водному середовищі. Дисертантка брала участь у комп'ютерному моделюванні та характеризуванні структури нанокомплексу,

дослідженнях його цитотоксичної та протипухлиної активності, а також токсикологічних властивостей. Спільно з науковим консультантом д.б.н., проф. Матищевською О.П. сформульовано основні наукові напрямки дисертаційної роботи та її мету, проаналізовано одержані результати та обговорено підготовку до друку статей за результатами проведених досліджень.

Апробація результатів дисертації.

Основні результати дисертації представлені та обговорені на: 1st Ukrainian-French School “Carbon Nanomaterials: Structure and Properties” (Берегове, Україна, 2009), VII Parnas Conference (Ялта, Україна, 2009), X Ювілейній науковій конференції молодих онкологів “Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології” (Київ, Україна, 2010), Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Берегове, Україна, 2010), X Українському біохімічному з’їзді (Одеса, Україна, 2010), V з’їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк, Україна, 2011), 36th FEBS congress “Biochemistry for Tomorrow’s Medicine” (Турин, Італія, 2011), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції “Біотехнологія ХХІ століття” (Київ, Україна, 2012), 37th FEBS congress “From Single Molecules to Systems Biology” (Севілья, Іспанія, 2012), 4th German-Ukrainian symposium “Physics and Chemistry of Nanostructures and nanobiotechnology” (Ільменау, ФРН, 2012), XII Міжнародній конференції з біоніки і прикладної біофізики (Київ, Україна, 2013), 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Росія, 2013), Summer school Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2013) (Буковель, Україна, 2013), 2nd Ukrainian-French school-seminar “Carbon Nanomaterials: Structure and Properties” (Берегове, Україна, 2013), IV Міжнародній науковій конференції “Нанорозмірні системи: будова, властивості, технології” (Київ, Україна, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), IV з’їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, Україна, 2014), V Ukrainian-Germany Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Київ, Україна, 2015), International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2016) (Львів, Україна, 2016),

International research and practice conference: Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2017) (Чернівці, Україна, 2017), XI Parnas Conference (Kyiv, Ukraine, 2018), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, Україна, 2019).

**Ступінь обґрутованості та достовірності наукових положень,
висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Дисертаційна робота Прилуцької С.В. є закінченим науковим дослідженням, яке виконано на високому методичному рівні. Сформульовані авторкою основні наукові положення та висновки обґрутовані значною кількістю експериментальних досліджень.

В експериментах *in vitro* використано нормальні та злюкісно трансформовані клітини різного гістогенезу та чутливості до хіміопрепаратів. Досліди *in vivo* проведено на дорослих миших інbredної лінії обох статей та миших-самцях лінії C57Bl/6 масою 20-22 г відповідно основним біоетичним нормам та правилам міжнародних і вітчизняних положень та принципів, які використовують у наукових цілях.

Дисерантка у роботі використала сучасні методи дослідження: протокову цитофлуориметрію, конфокальну і флуоресцентну мікроскопію, спектрофотометрію, спектрофлуориметрію (з використанням зондів DCFH-DA, індо-1 АМ, TMRE), зондову (атомно-силова та сканувальна тунельна) мікроскопію, спектроскопію (динамічне розсіювання світла, мало-кутове рентгенівське розсіювання), комп’ютерне моделювання (молекулярна динаміка та гнучкий докінг) тощо.

Для оцінки достовірності одержані експериментальні дані оброблено методами варіаційної статистики ANOVA з використанням t-критерію Стьюдента. Об’єм проведених досліджень, їх інформативність дозволили досягти високого ступеня обґрутованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Результати роботи дають чітку уяву про особливості досліджуваних процесів. Авторкою проведено детальне обговорення положень дисертації з

використанням сучасних літературних відомостей. Отже, наукові положення і висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими.

Повнота викладу результатів роботи у наукових публікаціях.

Отримані результати дисертації викладено у 79 наукових роботах, зокрема 31 стаття у фахових періодичних 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 та з'їздів.

Структура та загальна характеристика роботи.

Дисертація складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали, об'єкти та методи досліджень, власні результати досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел (545 посилань). Роботу викладено на 340 сторінках, проілюстровано 65 рисунками та 20 таблицями.

У «Вступі» аргументовано актуальність роботи, сформульовано мету і наукові завдання, висвітлено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок дисерантки, апробацію результатів. Поставленні автором завдання

В огляді літератури Прилуцька С.В. виділила три розділи, де охарактеризувала сучасний стан досліджуваної проблеми, акцентувавши увагу на зложісній трансформації клітин та розвитку резистентності пухлинних клітин до хіміопрепаратів; властивостях, механізмах дії та побічних ефектах цисплатину; біорозподілі C_{60} фулерену в організмі тварин та біологічній активності наноструктури.

Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень» містить інформацію про методи досліджень, використані для вирішення поставлених дисеранткою завдань. У розділі наведено перелік клітинних ліній, методів отримання біологічного матеріалу, використаних у біохімічних, цитологічних, гістологічних, гематологічних методах, схеми експериментів *in vitro* та *in vivo*, умови

фотозбудження C_{60} фулерену, фізичні методи для характеристики структури та стабільності водного колоїдного розчину виготовленого нанокомплексу.

Експериментальна частина дисертаційної роботи побудована за логічною схемою, виконана на високому науково-методичному рівні з використанням сучасного обладнання. Результати власних досліджень представлені у восьми розділах (3-10) дисертаційної роботи.

Розділ 3 «Мембранотропні властивості C_{60} фулерену» присвячений дослідженню взаємодії молекул C_{60} фулерену зі штучними біліпідними мембраниами, а також вивченю особливостей його внутрішньоклітинної локалізації у нормальніх та злойкісно трансформованих клітинах в системі *in vitro*. Авторкою показано, що C_{60} фулерен локалізувався у гідрофобних ділянках штучних ліпідних мембран, а також проникав крізь клітинну мембрану нормальних та злойкісно трансформованих клітин. Виявлено, що мічена карбонова наноструктура локалізується у цитоплазмі клітин ембріональної нирки людини (лінія HEK293) та клітин лімфоцитарної лейкемії миши (лінія L1210), а також у мітохондріях клітин гострої лімфобластної лейкемії (лінія CCRF-CEM).

Розділ 4 «Біологічна активність C_{60} фулерену на клітинному рівні» присвячений вивченю ефектів C_{60} фулерену на тимоцити і еритроцити щура, оцінці впливу C_{60} фулерену на нормальні та пухлинні клітини за такими показниками як життєздатність клітин та активність антиоксидантних ензимів, а також на цитоморфологічні та адгезивні властивості клітин MCF-7. Авторка встановила, що 10 мкМ C_{60} фулерен запобігав продукуванню АФК тимоцитами, спричиненому як 100 мкМ пероксидом водню, так і 3,3 мкМ цисплатином, H_2O_2 -індукованому зниженню життєздатності тимоцитів та Cis-Pt-індукованому гемолізу еритроцитів. У дозі 20 мкМ C_{60} фулерен не спричиняв токсичних ефектів щодо нормальніх клітин – не впливав на життєздатність тимоцитів та стійкість еритроцитів до гемолізу. Визначено особливості цитотоксичної дії C_{60} фулерену на злойкісно трансформовані клітини різного гістогенезу. Встановлено, що C_{60} фулерен знижував показник адгезії клітин MCF-7 до субстрату та впливав на розподіл клітин за фазами клітинного циклу.

Розділ 5 «Цитотоксична активність цисплатину щодо злюкісно трансформованих клітин різного гістогенезу та чутливості до цитостатиків» присвячений оцінці цитотоксичної дії цисплатину на злюкісно трансформованих клітинах різного гістогенезу (клітин HL-60 гострої промієлоцитарної лейкемії людини, клітин НСТ-116 колоректальної карциноми людини, клітин HeLa і KB-3-1 карциноми шийки матки людини і їх резистентних субліній, а також клітин LLC карциноми легені Льюїс миші) за показниками їх життєздатності. Отримані дані свідчать, що найменш чутливими до цитотоксичної дії цисплатину виявилися клітини LLC.

Розділ 6 «Взаємодія C₆₀ фулерену з ABC-транспортерами *in silico*» присвячений вивченю з використанням молекулярного докінгу взаємодії C₆₀ фулерену з АТФ-залежними мембраними транспортерами, а саме Р-глікопротеїном, MRP-1 і MRP-2, які обумовлюють стійкість злюкісно трансформованих клітин до цитостатиків різного механізму дії. Авторка встановила, що молекула C₆₀ взаємодіє з цими білками та викликає їх конформаційні зміни.

Розділ 7 «Комбінована дія фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину на чутливі та резистентні до цитостатику клітини L1210 лімфоцитарної лейкемії миші» присвячений дослідженю цитотоксичної активності та механізмів комбінованої дії C₆₀ фулерену та цисплатину по відношенню до чутливих та резистентних клітин ліній L1210/wt та L1210/Cis-Pt. Авторкою доведено, що використання фотозбудженого C₆₀ фулерену дозволяє підвищити цитотоксичну активність цисплатину по відношенню до клітин як чутливої, так і резистентної лінії. Встановлено, що одним з механізмів комбінованої дії фотозбудженого C₆₀ фулерену та цисплатину у клітинах лімфоцитарної лейкемії миші є посилення продукування АФК, підвищення концентрації цитозольного Ca²⁺, падіння мітохондріального потенціалу та накопичення клітин у проапоптичній SubG1 фазі.

Розділ 8 «Характеристика C₆₀ фулерену та нанокомплексу C₆₀ фулерену з цисплатином» присвячений дослідженю агрегатного стану C₆₀ фулерену у

водному розчині та характеристиці нанокомплексу C_{60} фулерену з цисплатином з використанням комп'ютерного моделювання та фізико-хімічних методів. Здобувач встановила, що у водному колоїдному розчині містяться частинки C_{60} фулерену розміром від 12 до 120 нм, де значну частину складають наночастинки діаметром порядку 43 нм. За допомогою молекулярного моделювання та фізико-хімічних методів, а саме динамічного розсіювання світла, атомно-силової мікроскопії, сканувальної тунельної мікроскопії та мало-кутового рентгенівського розсіювання було підтверджено комплексутворення між поодинокими молекулами C_{60} та Cis-Pt. Показано, що у водному розчині утворюється стабільний нековалентний C_{60} -Cis-Pt нанокомплекс із середнім гідродинамічним діаметром частинок 120 нм.

Розділ 9 «Біологічні ефекти C_{60} -Cis-Pt нанокомплексу в системі *in vitro*» присвячений дослідженню цитотоксичної активності нанокомплексу C_{60} -Cis-Pt по відношенню до нормальних та злокісно трансформованих клітин різного гістогенезу, а також вивченню механізмів загибелі клітин під впливом нанокомплексу. Авторкою встановлено, що нанокомплекс C_{60} -Cis-Pt має більший цитотоксичний ефект, порівняно з цисплатином, при дії на клітини як епітеліального так і лімфоїдного походження, а також клітини з фенотипом медикаментозної резистентності до цитостатиків. Визначено, що клітини досліджених ліній під впливом нанокомплексу C_{60} -Cis-Pt гинули переважно шляхом апоптозу.

Розділ 10 «Біологічні ефекти C_{60} -Cis-Pt нанокомплексу в системі *in vivo*» присвячений дослідженню гострої токсичності C_{60} фулерену та C_{60} -Cis-Pt нанокомплексу, а також вивченню його протипухлинної та антиметастичної дії. Дисеранткою встановлено достовірні відмінності стосовно LD₅₀ для нанокомплексу та цисплатину, а також доведено переваги його застосування порівняно з офіциальною формою цитостатику на моделі карциноми легені Льюїс.

У Розділі 11 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» дисерантка проводить аналіз і узагальнення власних результатів дослідження з

урахуванням літературних даних. На основі отриманих даних та наведених схем обговорюються можливі механізми цитотосичної дії цисплатину за умов його комбінованого впливу з фотозбудженим C_{60} фулереном та за використання нековалентного нанокомплексу $C_{60}\text{-Cis-Pt}$.

Зроблені автором висновки та положення, що виносяться на захист, обґрунтовані, логічно випливають із отриманих даних і відповідають поставленим меті і задачам.

Автореферат дисертациї повністю відповідає її змісту, адекватно відображає зміст усіх розділів дисертациї і висновків.

Зауваження до дисертациї.

У тексті дисертациї зустрічаються невдалі вислови, стилістичні вирази, граматичні, синтаксичні та технічні помилки.

Не зрозуміло чому дисертант у 5 розділі дисертаційної роботи оцінює чутливість до цисплатину щодо клітин, резистентних до цитостатиків іншого механізму дії (колхіцину, адраміцину тощо)

Для більш повного уявлення про токсикологічні властивості створеного $C_{60}\text{-Cis-Pt}$ нанокомплексу при дослідженні показників його гострої токсичності, необхідно було провести розрахунки MTD, а також вивчити параметри його фармакологічної безпеки на тваринах іншого виду і статі.

Запитання до дисертанта.

Який з досліджених Вами показник є провідним у механізмах реалізації антиметастатичних ефектів нанокомплексу $C_{60}\text{-Cis-Pt}$?

Чому, на Вашу думку, комплексоутворення цисплатину з фулереном, з одного боку, дозволяє підвищити його протипухлинну активність, а з іншого боку, збільшити у 2 рази LD_{50} ?

При дослідженні показників гострої токсичності Вами отримано дані, що підтверджують низьку токсичність C_{60} фулерену. Що відомо з даних літератури про кумулятивну токсичність C_{60} фулерену, а також органи-мішені його дії?

В той же час, слід відмітити, що наведені зауваження не мають принципового характеру, не знижують високого наукового рівня дисертації, а спрямовані тільки на її доповнення та вдосконалення.

Висновок.

За своєю актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, теоретичною і практичною значимістю отриманих результатів, логічністю та обґрунтованістю висновків представлена на захист дисертаційна робота Прилуцької Світлани Володимиривни «Розробка технології посилення протипухлиниої активності цисплатину за використання C_{60} фуллерену» відповідає вимогам п. п. 9,10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 (зі змінами внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України від 19.08.2015 р. № 656, № 567 від 27.07.2016 р.), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент

Доктор біологічних наук, старший дослідник,
завідувачка лабораторії механізмів медикаментозної резистентності
Інституту експериментальної патології, онкології і
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України



Н.Ю. Лук'янова

