

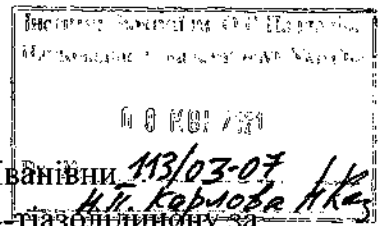
ВІДГУК

на дисертаційну роботу Кобилінської Лесі Іванівни
 “Біохімічні механізми протипухлинної дії похідних 4-тіазолідинону
 їхньої доставки у клітини нанорозмірним полімерним носієм”,

представленої на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

за спеціальністю 03.00.04 – біохімія (091 – Біологія)



Актуальність обраної теми. Хіміотерапія є ефективним методом лікування онкологічних хворих. Однак, багато хіміотерапевтичних лікарських препаратів мають негативні побічні ефекти коли пошкоджуються не тільки пухлинні клітини, а й здорові клітини печінки, серця, нирок чи нервової системи. Іншою важливою проблемою лікування онкохворих є виникнення резистентності до початково ефективних засобів. Ще однією проблемою хіміотерапії є погана розчинність багатьох препаратів в органічних розчинниках.

Одним з напрямків подолання цих проблем є використання нанотехнологій для спрямованої доставки лікарських препаратів до ракових клітин. Низка властивостей наночастинок (велика площа поверхні, здатність проникати у клітини та субклітинні структури і низька загальна токсичність) дозволяє розглядати їх як потенційно ефективних носіїв протипухлинних ліків. Наночастинки також здатні покращувати розчинність фармацевтичних препаратів, що приводить до покращення біодоступності, зниження дози препарату та кращого проникнення крізь гістогематичні бар'єри.

Перспективними протипухлинними речовинами є синтетичні похідні гетероциклічних сполук 4-тіазолідинону. Однак, вони погано розчиняються у воді та інших органічних розчинниках, що перешкоджає їх подальшому використанню у клініці. Натомість полімерні нанорозмірні носії можуть сприяти інкапсуляції та підвищенню розчинності вже існуючих і нових протипухлинних препаратів, слугуючи системами доставки ліків. Однак, на сьогодні біохімічні механізми взаємодії нових систем доставки на основі полімерних нанорозмірних носіїв та протипухлинних препаратів за їх дії *in vitro* та *in vivo*, а також токсикологічні аспекти застосування наноматеріалів у створенні нових протипухлинних засобів є практично не вивченими.

Враховуючи зазначене вище, дисертаційне дослідження Кобилінської Л.І. є актуальним у фундаментальному і практичному плані.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Обґрунтованість наукових положень, викладених в дисертаційній роботі Кобилінської Л.І. не викликає сумнівів. У своїй роботі авторка використовувала адекватні експериментальні методи, зокрема методи препаративної біохімії (визначення активності низки ензимів і концентрації низки метаболітів, електрофорез білків у гелі, Вестерн-блот аналіз білків), фізико-хімічні методи (світлова і флуоресцентна мікроскопія, спектрофлуориметрії,

спектрофотометрії), цитологічні (культивування клітин *in vitro*, проточна цитофлуориметрія, метод ДНК-комет, підрахунок кількості еритроцитів і лейкоцитів), біомедичні (лікування тварин з привитою пухлиною NK/Ly), методи хімічної кінетики та статистичного аналізу. Методики проведення дослідів доволі детально описані в дисертації.

Результати власних досліджень, отримані дисертанткою, відповідають меті та завданням наукового дослідження. Результати, представлені в дисертаційній роботі, викладені логічно, послідовно та добре проілюстровані. Висновки, отримані у дисертаційній роботі дисертанткою коректно сформульовані і адекватно відображають результати досліджень.

Достовірність і новизна наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Достовірність отриманих результатів, новизна наукових положень, висновків та рекомендацій дисертаційного дослідження не викликає сумніву. Дисертаційна робота Кобилінської Л.І. виконана на сучасному науково-методичному рівні. Достовірність змін підтверджена загальноприйнятими методами статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Проведено скринінг новосинтезованих похідних 4-тіазолідинону і відібрано три сполуки, які мають найбільш виражену цитотоксичну дію *in vitro* щодо низки пухлинних ліній клітин. Виявлено залежність між структурою активних хімічних груп і протипухлинною активністю. З'ясовано біохімічні механізми токсичного впливу синтетичних протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів. Встановлено, що нанорозмірний полімерний носій на основі поліетиленгліколю утворює водорозчинні комплекси з похідними 4-тіазолідинону, які швидше проникають у клітини і довше зберігають свою біологічну активність. При цьому покращується адресність дії протипухлинних сполук і суттєво знижуються токсичні характеристики досліджуваних протипухлинних речовин. Доведено, що похідні 4-тіазолідинону у складі нанокомплексів ефективніше, ніж у вільному стані, знижують життєздатність низки пухлинних клітин ссавців *in vitro*.

Продемонстровано цитоморфологічні зміни у пухлинних клітинах лінії С6 гліоми щура *in vitro* за дії похідних 4-тіазолідинону та їх комплексів з полімерним наноносієм. Проаналізовано зміни у фазах клітинного циклу *in vitro* на пухлинних клітинах лінії С6 гліоми щура та лінії U251 гліоми людини за дії похідних 4-тіазолідинону за їх застосування у вільному стані та у комплексі з ПЕГ-носіями.

На лінії С6 гліоми щура з'ясовано молекулярні механізми активації апоптозу та ступінь пошкодження ДНК й інтерналізацію в її структуру нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинону та їх комплексів з наноносієм.

Особливо слід відзначити розділ роботи, у якому використано сучасний молекулярний докінг аналіз *in silico* для ідентифікації молекулярних мішеней дії одного з похідних 4-тіазолідинону (Les-3833). Розраховано біофізичні показники водневих і гідрофобних зв'язків, які можуть утворюватись в активному центрі таких ензимів як топоізомераза II, CheckPoint кінази 1 і 2 і каспазами 6 і 8.

Ефекти протипухлинного похідного 4-тіазолідинону у складі комплексу з наноносієм також досліджували на моделі лімфоми NK/Ly *in vivo*. Зокрема, встановлено посилення ефективності дії похідного 4-тіазолідинону у складі комплексу з наноносієм на моделі лімфоми NK/Ly. Досліджено вплив метаболітів вільнорадикального окиснення, продуктів ліпопероксидації, ензимів системи антиоксидантного захисту, а також метаболітів і ензимів нітрозативного стресу на цитотоксичні ефекти *in vivo* похідних 4-тіазолідинону та їх комплексів з наноносієм.

Важливе наукове і практичне значення має розділ роботи, у якому встановлено пригнічення двома похідними 4-тіазолідинону (Les-3288 і Les-3833) росту лімфоми NK/Ly та збільшення тривалості життя мишей-пухлиноносіїв. У комплексі із полімерним носієм цей протипухлинний ефект тільки посилювався, а загальний токсичний вплив на організм мишей зменшувався.

За результатами проведеного дослідження запропоновано біохімічні механізми дії протипухлинних похідних 4-тіазолідинону в комплексі з ПЕГ-наноносієм, для яких характерна висока біологічна сумісність, здатність ефективно зв'язувати протипухлинні сполуки, проникати усередину клітин і доставляти молекули похідних 4-тіазолідинонів, без вираженої загальної токсичної дії в організмі лабораторних тварин.

На підставі ознайомлення з текстами дисертації та автореферату вважаю за потрібне зробити декілька зауважень та запитань до дисертантки для ініціювання наукової дискусії:

1. З автореферату (стор. 11) не зовсім зрозуміло, яка саме сполука є найбільш ефективною. Спочатку постулюється, що Les-3833 є у 2 і 26 разів ефективнішою порівняно із її структурними аналогами - Les-3288 і Les-3882. Однак, після цього наведено дані, що для, наприклад, SK-MEL-5 меланоми людини цитостатична концентрація Les-3288 є нижчою (1,24 мкмоль/л), ніж для Les-3833 (7,34 мкмоль/л). До того ж Les-3833 виявився досить нефротоксичним (стор. 19).
2. Високу цитотоксичну активність Les-3833 авторка пов'язує із атомом бром у індоліновому фрагменті та нафтильним радикалом у третьому положенні піразоліну. Але ж бром присутній у структурі Les-3288, а нафтильний радикал – у Les-3882. Чи є дані для похідного 4-тіазолідинону без бром і нафтильного радикалу?
3. Чому кліренс похідних 4-тіазолідинону досліджували на мишах, а ПЕГ-наноносіїв на щурах?
4. У таблиці 4 автореферату порівняння індексу оксидативного стресу, коли контрольні показники прийнято як 1,00±0,00, не є повністю коректним.
5. На рис. 18 автореферату, який демонструє динаміку зміни маси тіла мишей, не вистарчає ідентифікації кривих та показників достовірності на них.
6. Чи відіграють мітохондрії пухлинних клітин важливу роль у реалізації антипроліферативних ефектів похідних 4-тіазолідинону та ПЕГ-наноносіїв?

7. Хотілося б почути думку авторки дисертації щодо протипухлинної активності досліджуваних нею похідних 4-тіазолідинону в порівнянні із похідними тіазолу.

8. Шкода, що у рефераті не знайшлося місця узагальнюючій схемі роботи, в той час як у дисертації таких інформативних і вдалих схем є декілька.

Зауваження і запитання, які виникли до рецензованої роботи, носять здебільшого дискусійний характер і не знижують наукової цінності отриманих результатів.

Повнота викладу наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, в опублікованих працях. Результати, отримані у дисертаційному дослідженні представлені у наукових фахових виданнях, де в повному обсязі викладені наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані у дисертаційній роботі. Результати дисертації надруковані в 54 публікаціях, зокрема в 24 статтях, 13 з яких належать до наукометричної бази Scopus. Авторка апробувала результати і висновки своєї роботи на наукових конференціях в Україні, Польщі, Словаччині, Чехії, Угорщині, Хорватії, Ізраїлі, Франції та США.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано ефективний спосіб доставки нових протипухлинних синтетичних похідних 4-тіазолідинону за допомогою водорозчинного ПЕГ-вмісного полімерного нанорозмірного носія, який підвищує розчинність і посилює біологічну активність потенційних протипухлинних препаратів. Запропоновано протоколи створення комплексів протипухлинних полук з полімерним ПЕГ-вмісним наноносієм, які можуть бути застосовані для розроблення ефективної доставки протипухлинних сполук у ракові клітини. Нанорозмірні носії дозволяють знизити можливі негативні побічні кардіо-, гепато- і нефротоксичні ефекти протипухлинних ліків в організмі та збільшити тривалість дії протипухлинних чинників в організмі.

Авторка разом з колегами одержала Патент України на корисну модель «Спосіб зниження негативних побічних реакцій доксорубіцину за допомогою нанорозмірного полімерного носія» та подала заявку на Патент України на винахід «Спосіб доставки протипухлинної сполуки похідного 4-тіазолідинону, підвищення її розчинності та біологічної активності за допомогою нанорозмірного полімерного носія».

Відповідності дисертації встановленим вимогам. Рукопис оформлений згідно існуючих вимог за класичним зразком. Дисертація написана грамотною українською науковою мовою і містить наступні розділи: Вступ, Огляд літератури, Матеріали і методи досліджень, Результати досліджень та їх обговорення, Аналіз та узагальнення результатів дослідження, Висновки, Перелік використаних літературних джерел.

Висновок. Дисертаційна робота Кобилінської Лесі Іванівни на тему «Біохімічні механізми протипухлинної дії похідних 4-тіазолідинону за їхньої доставки у клітини нанорозмірним полімерним носієм» є завершеним самостійним

дослідженням, виконаним на високому теоретичному і методологічному рівнях. Висловлені опонентом зауваження не є підставою для заперечення високої оцінки цієї роботи. За актуальністю теми, методичним рівнем проведених досліджень, їх об'ємом, науковою новизною і науково-практичним значенням одержаних результатів, а також адекватністю проведеного в роботі аналізу і відповідністю зроблених висновків, дисертаційна робота Кобилінської Л.І. 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 заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія."

Опонент:

завідувач кафедри біофізики та біоінформатики
Львівського національного університету
імені Івана Франка,
доктор біологічних наук,
професор



Бабський А.М.

1 квітня 2021 р.

Підпис професора Бабського А.М. підтверджую.
Вчений секретар Львівського національного університету
імені Івана Франка,
доцент



Грабовецька О.С.