

Відзив офіційного опонента

13 КВІ 2021

на дисертаційну роботу Кобилінської Лесі Іванівни
“Біохімічні механізми протипухлинної дії похідних 4-тіазолідинону за їхньої доставки у клітини нанорозмірним полімерним носієм”,
 представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
 за спеціальністю 03.00.04 – біохімія (091 – Біологія)

Гетероциклічні похідні 4-тіазолідинону, є перспективною групою біологічно активних речовин, які володіють різним спектром дії, зокрема протипухлинною активністю. Проте, через низьку розчинність цих сполук у воді молекулярні біохімічні механізми їх впливу на нормальні клітини залишаються погано дослідженими. Більшість протипухлинних медикаментозних засобів, які використовують у хіміотерапії, викликають тяжкі побічні ефекти у пацієнтів за рахунок їхньої токсичної дії не лише щодо злякисних, але й нормальних клітин. Одним із ефективних шляхів для підвищення адресності дії і зниження загальної токсичності протипухлинних препаратів може бути їхня доставка за допомогою спеціальних нанорозмірних носіїв природного чи синтетичного походження. Перевага препаратів на основі наноматеріалів над традиційними ліками полягає у продовженні часу їхньої циркуляції в організмі, здатності тривалий час зберігати високу ефективність і бути представленими у необхідній дозі в конкретному місці.

Тому використання специфічних носіїв, які захищають здорові клітини організму від негативного впливу протипухлинних препаратів і підвищують терапевтичний ефект хіміопрепарату є **актуальним завданням**.

Відповідність роботи спеціальності 03.00.04 – біохімія. Дисертаційна робота Кобилінської Л.І. містить достатньо експериментального матеріалу, який за науково-методичними критеріями відповідає спеціальності «біохімія». Разом з тим, у роботі здійснені цитологічні і молекулярно-біологічні дослідження. Необхідно підкреслити, що в наш час саме такі міждисциплінарні роботи найкраще сприймаються науковою громадськістю.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького у рамках планових досліджень кафедри за бюджетною темою «Дослідження ролі газових медіаторів у процесах цито- та органопротекції та оцінка дії нових протипухлинних препаратів», номер держреєстрації 0115U000040 (2014–2019). Частину роботи виконано в рамках договорів про науково-медичну співпрацю між Львівським національним медичним університетом імені Данила Галицького, Інститутом біології клітини НАН України, Інститутом фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Інститутом біології тварин НААН України і Державним науково-дослідним контрольним інститутом ветеринарних препаратів та кормових добавок. Окремі частини роботи були підтримані 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), а також дослідницькими грантами фонду Богдана Малаянка «Супермагнітні наночастинки оксиду заліза як візуалізуючий агент і носій протипухлинних ліків» (2017–2019) та «Імунна відповідь комплексів похідних 4-тіазолідинону з ПЕГ-вмісним полімерним наноносієм» (2019–2020). Така співпраця дозволила налагодити широкі контакти з міжнародними і вітчизняними науковими установами і свідчить про набуття дисертанткою значного науково-методичного досвіду роботи.

Наукова новизна отриманих результатів. Дисертантка вперше створила водорозчинні комплекси похідних 4-тіазолідинону з нанорозмірним полімерним носієм, що дозволило не лише вирішити проблему розчинності цих нових протипухлинних сполук, але й суттєво знизити їхню загальну токсичність в організмі тварин. Експериментально доведено, що введення тваринам (лабораторні миші і щури) створених водорозчинних комплексів протипухлинних похідних 4-тіазолідинону сприяє зменшенню їх кардіо-, гепато- і нефротоксичної дії.

Вперше доведено, що нові протипухлинні похідні 4-тіазолідинонів у складі нанокомплексів з полімерним носієм ефективніше, ніж у вільному стані, знижують життєздатність пухлинних клітин ссавців *in vitro*. Визначено молекулярні механізми індукції апоптозу, вміст білкових маркерів апоптозу, а також ступінь пошкодження ДНК протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів та їхніх комплексів з наноносієм у клітинах лінії С6 гліобластоми щура.

У роботі встановлено посилення ефективності дії протипухлинного похідного 4-тіазолідинону у складі комплексу з досліджуваним полімерним наноносієм на моделі мишачої лімфоми NK/Ly *in vivo*. За результатами проведеного дослідження запропоновано біохімічні механізми дії функціоналізованих комплексів полімерного наноносія і з протипухлинними похідними 4-тіазолідинонів.

Науково-практична цінність роботи. Рецензована дисертаційна робота має безпосереднє відношення до практичної медицини, зокрема застосування хіміотерапії в онкології. Авторкою роботи запропоновано доставку протипухлинних сполук в комплексі з водорозчинним ПЕГ-вмісним полімерним нанорозмірним носієм для підвищення розчинності і посилення біологічної активності похідних 4-тіазолідинону. Така форма доставки похідних 4-тіазолідинону дозволяє знизити негативні побічні ефекти протипухлинних ліків в організмі і пролонгувати їхню дію в організмі. За результатами дослідження запропоновано метод створення систем доставки активних фармацевтичних інгредієнтів на основі полімерного наноносія. Авторкою одержано Патент України на корисну модель (№ u 2020 03453 від 09.06.2020 р.) на спосіб зниження негативних побічних реакцій доксорубіцину за допомогою нанорозмірного полімерного носія і Патент України на винахід (№ a 2019 08944 від 25.07.2019 р.) на спосіб доставки протипухлинної сполуки, підвищення її розчинності та біологічної активності за допомогою нанорозмірного полімерного носія.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційна робота Кобилінської Л.І. пройшла апробацію на чисельних міжнародних конференціях у Європі і США, зокрема на Європейських біохімічних форумах FEBS (2014, 2017, 2019) та

Українських біохімічних конгресах (2014, 2019), на яких авторка мала усні чи стендові доповіді.

Особистий внесок здобувачки добре зрозумілий з її співавторства у публікаціях за темою дисертаційної роботи.

Мета роботи сформульована лаконічно із зазначенням головних напрямків запланованого дослідження.

У дисертаційній роботі вирішували **9 основних завдань**, які були необхідні для досягнення поставленої мети дослідження.

Методи дослідження, використані під час виконання дисертаційної роботи, є досить різноманітними, але в цілому адекватні спеціальності 03.00.04 – біохімія. Необхідно відзначити застосування в роботі цитологічних методів дослідження, які стали доступними завдяки співпраці з Інститутом біології клітини НАН України, а також особистій ініціативі дисертантки, яка виконувала спільні вітчизняні і міжнародні проекти.

У списку робіт, опублікованих за результатами дисертаційної роботи, налічується 56 друкованих наукових праць, з них 24 статті, серед яких 15 статей, включених до міжнародної наукометричної бази Scopus. Серед публікацій – 6 статей в Українському біохімічному журналі – фаховому виданні в Україні зі спеціальністю 03.00.04 – біохімія. Необхідно відзначити, що у переважній більшості публікацій дисертантка є першим автором, що свідчить про самостійність дослідження.

Структура та обсяг дисертації. Рукопис дисертаційної роботи викладений на 327 сторінках машинописного тексту і містить всі необхідні розділи – “Вступ”, “Огляд літератури”, опис “Матеріалів і методів дослідження”, розділ “Результати та обговорення власних досліджень”, “Підсумок та узагальнення результатів дослідження”, “Висновки”, “Список використаних джерел” (понад 300 посилань), “Додатки”. Робота містить 60 рисунків і 34 таблиці, що свідчить про її великий об’єм. Дисертаційна робота Кобилінської Л.І. є добре структурованою і написана сучасною українською мовою.

Вступ написаний чітко, у ньому охарактеризовано наукову проблему виконаної роботи, зокрема обґрунтовано актуальність теми, мету, завдання.

Огляд літератури логічно структурований, містить систематизовану інформацію стосовно механізмів використання систем доставки ліків на основі нанорозмірних носіїв. Особлива увага відведена підвищенню ефективності і безпеки використання протипухлинних сполук. Матеріали, наведені в огляді літератури, свідчать про ґрунтовні знання автора щодо сучасного стану обраної галузі дослідження, а також про критичне відношення до опублікованих результатів, здатність їх узагальнювати, чітко викладати стан і перспективи власних досліджень. В кінці Огляду літератури наведене узагальнення результатів досліджень за темою роботи та існуючих проблем.

Матеріали і методи дослідження описані детально. У роботі застосовані біохімічні, цитологічні, морфологічні, токсикологічні, фізико-хімічні, фізичні, клінічні, статистичні методи та комп’ютерне моделювання. У дисертації і авторефераті наведена інформація про дотримання норм біоетики на усіх етапах дослідження.

Результати експериментальних досліджень викладені у розділі 3, який складається з 7-ми розділів (3.1 – 3.7) власних досліджень авторки та їхнього аналізу. Виклад результатів є послідовним, логічним і достатньо повно описаним. Позитивною рисою роботи є комплексний підхід до вирішення наукових проблем, зокрема проведення модельних досліджень *in silico*, *in vitro* та *in vivo*. Використовуючи нанорозмірний полімерний носій, створено комплекси похідних 4-тіазолідинону з наноносієм, що дозволило суттєво знизити загальну токсичну дію цих протипухлинних речовин в організмі.

Розділ 3.1 містить інформацію про проведення скринінгу нових похідних 4-тіазолідинону і відбір трьох сполук (Les-3833, Les-3288 і Les-3882), які володіють найвищою протипухлинною активністю. Виявлено взаємозалежність між наявністю активних хімічних груп у базовій структурі похідних 4-тіазолідинону та їхньою протипухлинною активністю. У розділі великий підрозділ відведений молекулярному докінг-аналізу на предмет афінності сполуки Les-3833 до ензимів CheckPoint кінази 1, мітоген-активованої протеїнкінази, каспази-6, каспази-8, топоізомерази II.

Розділ 3.2 присвячений оцінці антинеопластичної активності похідних 4-тіазолідинону *in vitro*. За результатами досліджень на ряді пухлинних клітин простежено ранжування зростання цитотоксичності похідних 4-тіазолідинону щодо цих клітин: Les-3882 < Les-3833 < Les-3288 \approx доксорубіцин.

У розділах 3.3 і 3.4 описано токсикологічні характеристики сполук Les-3833, Les-3288 і Les-3882, ПЕГ-вмісного наноносія і його комплексів з цими похідними у лабораторних мишей і щурів. Визначено показники гострої токсичності, біорозподіл *in vivo* і шляхи виведення досліджуваних похідних 4-тіазолідинону, полімерного наноносія та їхніх комплексів у лабораторних щурів і мишей.

Розділ 3.5 дуже об'ємний, він містить результати отриманих біохімічних показників, які характеризують токсичний вплив доксорубіцину, синтетичних протипухлинних похідних 4-тіазолідинону та їхніх комплексів з полімерним наноносієм. На мою думку, у розділах 3.5.1 і 3.5.2 не варто було настільки детально описувати всі отримані результати біохімічних змін активності ензимів і концентрації метаболітів.

У розділі 3.6 продемонстровано, що досліджувані похідні 4-тіазолідинону у складі наноконкомплексів з полімерним носієм ефективніше, ніж у вільному стані, знижують життєздатність *in vitro* пухлинних клітин ссавців. Запропоновано молекулярні механізми індукції апоптозу досліджуваними похідними 4-тіазолідинону з протипухлинною активністю та їхніми комплексами з полімерним наноносієм у клітинах С6 гліоми щура.

Розділ 3.7 присвячений результатам дослідження протипухлинної дії Les-3288, Les-3833 і комплексу Les-3833 з наноносієм на моделі лімфоми Немет-Келнера. Продемонстровано посилення ефективності дії похідного Les-3833 у комплексі з полімерним наноносієм на моделі лімфоми NK/Ly у мишей.

Узагальнення результатів досліджень та їхній аналіз є доволі об'ємним (27 сторінок) і ключовим у дисертаційній роботі Кобилінської Л.І. У цьому розділі авторка детально аналізує і обговорює результати власних досліджень, порівнюючи їх із існуючими даними літературних джерел, висловлює власні думки

про механізми дії досліджуваних протипухлинних сполук, чим робить важливий вклад у подальше практичне застосування отриманих результатів.

Висновки. За результатами досліджень автором зроблено 11 висновків, які написані лаконічно і впливають із отриманих результатів.

У списку використаних джерел – понад 300 посилань, з яких 240 – англійською мовою. Більшість посилань на роботи останніх 5-10 років, а серед англійськомовних літературних джерел багато публікацій за 2019-2020 р.р.

Автореферат дисертаційної роботи достатньо повно висвітлює її зміст.

Разом із загальною високою оцінкою рівня і науково-практичного значення дисертаційної роботи Кобилінської Л.І. у рамках наукової дискусії в опонента виник ряд запитань і редакційних зауважень.

Запитання:

1. Якими є основні біохімічні механізми дії похідних 4-тіазолідинону у клітині?
2. Які фізико-хімічні зв'язки утворює доксорубіцин і похідні 4-тіазолідинону в їхніх комплексах з полімерним носієм?
3. Чому комплексування протипухлинних речовин з полімерним носієм підвищує ефективність цитотоксичної дії цих сполук *in vitro* та *in vivo*?
4. Автор порівнює протипухлинну активність нових похідних 4-тіазолідинону з такою активністю відомого препарату доксорубіцину. Чи існує подібність у токсичній дії цих чинників?

Редакційні зауваження:

1. Завдання 6 “Визначити біохімічні показники токсичної дії (активність індикаторних ензимів, вміст продуктів вільнорадикального окиснення, прооксидантно-антиоксидантний баланс) похідних 4-тіазолідинону, доксорубіцину та їх комплексів з ПН у крові та органах лабораторних щурів” доцільно було розділити на кілька окремих завдань, оскільки воно охоплює дуже великий обсяг експериментального матеріалу.
2. Узагальнення, наведене в кінці розділу «Огляд літератури» доцільно було доповнити власною, чи взятою з літератури схемою переваг і недоліків застосування різних систем доставки ліків.
3. Не доцільно було описувати принципи біохімічних методів визначення активності ензимів і концентрації метаболітів, які здійснювали, використовуючи стандартні тест-набори для автоматичного біохімічного аналізатора Humalyzer 3000 (Німеччина).
4. У роботі бажано застосовувати термін активні форми кисню, замість терміну активні форми оксигену.

Звичайно, ці редакційні зауваження нескладно усунути і вони не мають вирішального значення під час оцінки дисертаційної роботи Кобилінської Л.І.

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 запитання і редакційні 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 авторка заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент
завідувачка відділу функціональної геноміки
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України
доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Риндич

Риндич А.В.

Київ, 12 квітня 2021 р.

