

8 - жов 2020

Вх. № 101/03-07

ВІДЗИВ

офіційного опонента про дисертацію

Прилуцької Світлани Володимирівни

«РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ПОСИЛЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ ЦИСПЛАТИНУ ЗА ВИКОРИСТАННЯ C₆₀ ФУЛЕРЕНУ»

представлену на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

за спеціальністю 03.00.20 - Біотехнологія

Онкологічні захворювання становлять одну з найбільш поширених причин інвалідності та смертності в розвинутих країнах. До вкрай небезпечних і доволі розповсюджених в людських популяціях варіантів злоякісного переродження відносяться різні види лейкемій та карцином тощо.

Наразі майже універсальним підходом до медикаментозного лікування злоякісних новоутворень є використання протипухлинних агентів на кшталт цисплатину, доксорубіцину, паклітаксалу тощо. Біохімічними механізмами дії такого широковживаного протипухлинного препарату як цисплатин є утворення аддуктів з ДНК, а також неядерні ефекти: Ca²⁺-перевантаження клітин та гіперпродукція ними активних форм кисню. Зазначені процеси приводять до загибелі злоякісних клітин шляхом апоптозу/некрозу залежно від концентрації лікарської речовини, чим і забезпечується позитивна хіміотерапевтична дія. Втім, застосування цисплатину у ефективних концентраціях спричинює також тяжке ураження нормальних тканин організму, наслідком чого є численні побічні ефекти при застосуванні цього препарату (нефро-, гепато-, кардіотоксичність тощо). З іншого боку, в пухлинних клітинах виникає явище резистентності до цисплатину, пов'язане як з пригніченням акумуляції препарату у клітинах, так і з його інактивацією, а також посиленням процесів репарації ДНК та мутації в сигнальних протеїнах. Відмічають також низьку селективність цього препарату. Зазначені ефекти обмежують застосування цисплатину у терапевтичних

дозах. **Отже, нагальним є вирішення біотехнологічної проблеми оптимізації дії цисплатину.**

Розробка нових підходів застосування традиційних хіміопрепаратів у комбінації з наноматеріалами, які виявляють біологічну активність, є важливим колом завдань сучасної біотехнології та онкології. Як органічні, так і неорганічні наноносії здатні модифікувати біологічну дію цисплатину. Великий інтерес викликають нетоксичні наноматеріали, які можна використати для таргетної доставки цисплатину та посилення його протипухлинних ефектів. Такими перспективними сполуками можуть бути фулерени, зокрема C_{60} . Ці карбонові наноструктури сферичної форми є малотоксичними, взаємодіють з цисплатином, вбудовуються в ліпідний бішар мембран клітин і проникають в цитоплазму, а також, як вважає ряд дослідників, володіють вибірковістю щодо взаємодії з пухлинними тканинами. Внаслідок існування системи кон'югованих π -зв'язків на поверхні молекули C_{60} і делокалізованих електронів, ця сполука має потужні окисно-відновні властивості. Фулерен є електронodefіцитною молекулою, що зумовлює електронно-акцепторну здатність, легкість взаємодії з вільними радикалами і, відповідно, антирадикальні/антиоксидантні властивості (скавенджер гідроксил-радикалу та супероксид-аніону). Водночас за умови фотозбудження на поверхні C_{60} продукуються активні форми кисню, що дозволяє його використання в фотодинамічній протипухлинній терапії. Комбінована дія або кон'югація C_{60} з цисплатином, як передбачають, може покращити фармакокінетику хіміопрепарату, знизити побічні ефекти, посилити таргетну взаємодію та ефективність проникнення саме в пухлинні клітини. Перспективним є проведення біохімічних досліджень щодо ефективності поєднання цисплатину та фулерену C_{60} для підсилення цитостатичної дії та подолання резистентності онкоклітин до протипухлинного препарату. Вкрай важливим є також вирішення питання перспективності використання незбудженого фулерену з метою запобігання надмірній токсичній дії цисплатину на нормальні клітини.

Отже, мета дисертаційної роботи Прилуцької Світлани Володимирівни, а саме: розробити технології застосування C_{60} фулерену для підвищення протипухлинної ефективності цисплатину у системах *in vitro* та *in vivo* і з'ясувати механізми сумісної дії цисплатину з фотозбудженим C_{60} фулереном та у складі нековалентного наноконплексу C_{60} -Cis-Pt, є актуальною. У відповідності до мети дисертанткою коректно сформульовані задачі дослідження.

Структура рукопису відповідає класичній схемі. Він включає інформацію щодо сучасного стану проблеми та ряду нез'ясованих питань, опис методичних підходів автора, наведено результати власних досліджень із відповідним обговоренням. Текст дисертаційної роботи закінчується висновками та списком використаної літератури, а також додатками.

Розділ «Огляд літератури» містить достатньо повний аналіз сучасних даних з таких питань, як: стадії та молекулярні механізми онкогенезу; проблема розвитку резистентності до хіміопрепаратів; структура та фізико-хімічні властивості цисплатину; застосування цисплатину в хіміотерапії, механізми його дії на онкоклітини, проблема побічних ефектів, виникнення резистентності та перспективи подальшого клінічного використання; застосування наноносіїв для таргентної доставки протипухлинних препаратів; характеристика фулеренів як карбонових наночасток і, зокрема, фулерену C_{60} ; біодоступність, розподіл, механізми проникнення та локалізація фулерену C_{60} в клітинах; біологічна активність і, зокрема, протипухлинна дія фулерену C_{60} , у тому числі в комбінації з хіміопрепаратами. В кінці авторка розміщує підсумовуючий абзац, що лаконічно окреслює проблему, яка буде експериментально вирішуватися в дисертаційній роботі.

В розділі «Матеріали і методи дослідження» дано вичерпний опис сучасних адекватних поставленим задачам методів, які було використано дисертанткою, зокрема клітинної біології, біохімії, гістології, токсикології, експериментальної онкології і інш. Авторкою були використані численні

методи мікроскопії (світлової, фазово-контрастної, конфокальної і флуоресцентної), спектрофотометрія та протокова цитофлуориметрія тощо. Для з'ясування агрегатного стану, розмірів та стабільності наночастинок фулерену і нанокмлексу C_{60} -Cis-Pt у водних розчинах було застосовано такі прецизійні фізичні підходи як динамічне розсіювання світла та сканувальна тунельна мікроскопія, а також методи комп'ютерного моделювання. Використання напрочуд широкого арсеналу методів робить висновки з представленої роботи високою мірою обґрунтованими.

В рубриці «Результати досліджень» (розділи 3-10, власне результати експериментальних досліджень, а також розділ 11 – «Аналіз та узагальнення результатів дослідження») авторкою викладено основні експериментальні результати з їхнім ґрунтовним аналізом. В процесі проведення експерименту Прилуцькою Світланою Володимирівною доведено відсутність токсичної дії C_{60} фулерену та досліджено захисні властивості сполуки C_{60} щодо нормальних клітин. Зокрема показано, що C_{60} не спричиняв цитотоксичних та гемолітичних ефектів: не впливав на виживаність нормальних та пухлинних клітин та на стійкість еритроцитів до гемолізу. Дисертанткою встановлено, що досліджуваний фулерен запобігає продукуванню активних форм кисню тимоцитами за дії цисплатину та пероксиду водню, H_2O_2 – індукованій загибелі тимоцитів та викликаному цисплатином гемолізу еритроцитів. Доведено, що гідрофобний C_{60} взаємодіє з плазматичною мембраною, проникає в лейкозні клітини та накопичується в мітохондріях. Методом молекулярного докінгу продемонстровано, що C_{60} взаємодіє з АТР-залежними транспортерами ксенобіотиків (хіміопрепаратів), що може зумовлювати затримку цисплатину у таргетних клітинах з пролонгацією лікарської дії. Оцінено комбіновану дію фулерену, у разі його фотоактивації, та цисплатину на лейкозні клітини дикого типу. Показано, що за цих умов токсичний ефект цисплатину за низьких концентрацій посилювався. Поряд з цим, за комбінованої дії досліджуваних сполук на резистентні до цисплатину лейкозні клітин дія протипухлинного препарату відновлювалась.

Встановлено, що комбінована дія сполук проявляється в цитотоксичному зростанні концентрації Ca^{2+} в цитозолі, гіперпродукції активних форм кисню, деполяризації внутрішньої мітохондрійної мембрани і переході резистентних/чутливих лейкозних клітин до апоптозу. Відновлення чутливості резистентних клітин до дії цисплатину за умови його комбінації з фотозбудженим фулереном вказує на мультитаргетний вплив наноструктури, в тому числі на системи, які забезпечують явище резистентності.

Дисертанткою вперше створено і охарактеризовано комплекс цисплатину з C_{60} . Зокрема доведено, що він утворюється і стабілізується нековалентними зв'язками, є відносно стабільний у водних розчинах і має розміри біля 120 нм згідно результатів фотонної кореляційної спектроскопії. Формування вищезазначеного комплексу підтверджено методами комп'ютерного моделювання. В дисертаційній роботі було вперше порівняно ефективність протипухлинної дії цисплатину окремо та його нанок комплексу з C_{60} у випадку карциноми легень Льюїс *in vitro* та *in vivo*. Доведено, що токсичність нанок комплексу щодо пухлинних клітин є більшою, ніж вільного цисплатину. Причому токсичний ефект реалізується шляхом індукції апоптозу, зокрема активації відповідних каспаз. Нанок комплекс більш ефективно пригнічував ріст перещепленої карциноми легень та гальмував утворення метастазів у легенях мишей, ніж цисплатин окремо. За умови дії комплексу подовжувалась тривалість життя піддослідних тварин, нормалізувалась маса тіла та показники крові. Продемонстровано низьку токсичність досліджуваного фулерену за внутрішньочеревного введення мишам. Дуже важливо, що за умови комплексоутворення токсичність цисплатину суттєво знижувалась.

В ході виконання дисертаційної роботи Прилуцькою С.В. розроблені технології суттєвого підвищення протипухлинної активності хіміопрепаратів, зокрема цисплатину, шляхом його комбінованої дії з C_{60} фулереном (застосування фотодинамічного потенціалу останнього) та створення нековалентного нанок комплексу між цими сполуками. При цьому знижується

загальна токсичність цисплатину, а відсутність токсичної дії фулерену на нормальні клітини, а також захист від пошкоджувальної дії цисплатину та пероксиду водню, створює можливість застосування C₆₀ як цитопротектора. Представлені в дисертаційній роботі результати розширюють уявлення про механізми взаємодій наноструктур з клітинами, шляхи реалізації їхніх біологічних ефектів. Одержані дані вкрай важливі для подальшої розробки і застосування нових протипухлинних препаратів. Отже, **наукове і практичне значення зробленої роботи безсумнівне.**

Наведені в кінці дисертації висновки впливають з завдань і є правомірними. Рисунки демонстративні, наведена коректна статистична обробка експериментальних результатів. Використано численні сучасні методи дослідження, які повністю відповідають меті та завданням роботи. Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України. Результати досліджень ілюстровано 65 рисунками і 20 таблицями. Список літератури достатньо великий (545 посилань) і містить значну кількість сучасних посилань. Результати досліджень, які викладені в дисертації, опубліковані в відкритому друці у вигляді 79 публікацій, серед них 31 стаття в фахових виданнях, які затверджено ДАК МОН України (23 включено до наукометричної бази Scopus), 2 розділи у монографіях, 2 патенти України на винахід, 44 тези доповідей у збірниках матеріалів конференцій, конгресів та з'їздів. Привертає увагу значна кількість публікацій в закордонних журналах.

Позитивною рисою роботи є комплексний підхід до вирішення наукової проблеми, зокрема проведення досліджень *in vitro* та *in vivo*, використання кількох моделей пухлин. Дисертанткою застосовано численні сучасні методи досліджень, в тому числі біохімії, молекулярної біології, фізики, фізичної хімії, цитології, експериментальної онкології тощо. Здійснено аналіз значної кількості біохімічних та морфологічних параметрів; використані методи комп'ютерного моделювання. Все це дозволяє говорити про системний підхід дослідниці до вирішення мети дисертації та високу наукоємність останньої. Покращують сприйняття роботи короткі висновки

після експериментальних підрозділів та заключні схеми. Очевидним є суттєвий внесок Прилуцької С.В. в розвиток сучасної нанобіотехнології та онкології. Втім, при аналізі рукопису виник ряд зауважень і запитань.

Зауваження:

1. «Актуальність теми» доречно було б почати з характеристики пов'язаних зі злоякісними новоутвореннями медико-біологічних та соціальних проблем.

2. Підрозділ «предмет дослідження» повинен бути більш компактним.

3. З огляду на біотехнологічне спрямування роботи, підрозділ «практичне значення» міг би бути більш об'ємним.

4. Бажано застосовувати термін активні форми кисню, а не кисню.

Запитання:

1. Який, з Вашої точки зору, механізм проникнення як C_{60} , так і його комплексу з цисплатином, до мітохондрій? Які фізико-хімічні процеси відбуваються з досліджуваними наночастинками і наноконкомплексом в клітинах? В якому вигляді і наскільки швидко виводяться ці сполуки з організму?

2. Які біохімічні механізми вибіркового накопичення C_{60} в пухлинних клітинах?

3. Чи можна, на основі Ваших результатів припустити, що C_{60} є інгібітором АВС-транспортів? Як наночастинки відновлюють ендцитоз цисплатину?

4. В усіх досліджених Вами випадках за дії хіміопрепаратів та наносполук ріст пухлинних клітин до певної межі гальмується, лише частково гинуть злоякісні клітини, метастазування зникає далеко не повністю. Яка практична ефективність запровадження такого лікування?

Побажання:

1. Актуальними продовжують бути дослідницькі зусилля щодо вирішення проблеми шляхів введення наноструктур до організму онкохворих та практичного застосування фотодинамічної терапії в клініці.

Наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність проведеного дослідження. Характеризуючи роботу в цілому можна стверджувати, що вона відповідає профілю 03.00.20 - Біотехнологія. За актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичною і практичною цінністю, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску автора і зроблених висновків дисертація є окремим завершеним дослідженням, яке **вирішує наукову проблему**, і відповідає вимогам п.п. 11, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015. Вважаю, що Прилуцька Світлана Володимирівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - Біотехнологія.

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Данилович Ю.В.



05.10.20 р.



Підпис *Даниловича Ю.В.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
"05" 10 2020 р. *[Signature]*