

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Козак Юлії Сергіївни «**Механізми дії антиоксидантів у модуляції терапевтичного ефекту протипухлинних препаратів на моделях експериментальних пухлин у мищі**», подану до захисту у спеціалізовану вчену раду К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

Актуальність обраної теми.

Злоякісні новоутворення – одне з найбільш небезпечних захворювань сучасності. Смертність від раку постійно збільшується у зв'язку з погіршенням екології і “старінням” населення. На сьогоднішній день хіміотерапія залишається одним з найбільш дієвих методів лікування онкозахворювань, але значним її недоліком є недостатня вибірковість дії, що призводить до загибелі не лише пухлинних, але й здорових клітин в організмі хворого. Надлишок активних форм Оксигену (АФО) індукує запуск програми «самознищення» нормальних клітин організму, що і є основною причиною гепато-, кардіо- і нефротоксичності таких відомих протипухлинних препаратів, як доксорубіцин і цисплатин. Слід зазначити, що основним механізмом їх дії є інтеркаляція в структуру ДНК злоякісних клітин, тоді як продукція АФО є побічним продуктом дії цих лікарських засобів, який суттєво не впливає на їх протипухлинну активність, але в той же час є дуже шкідливим для нормальних клітин. Тому можна припустити, що блокування АФО специфічними антиоксидантними чинниками повинно суттєво знизити токсичну дію цисплатину і доксорубіцину на нормальні клітини організму, не впливаючи при цьому на їхню протипухлинну активність. Крім цього, значною проблемою сучасної хіміотерапії є швидкий розвиток множинної медикаментозної резистентності (ММР) злоякісних клітин, що істотно послаблює ефективність лікування онкохворих. Тому, важливим є розроблення нових стратегій лікування для збільшення вибірковості дії відомих протипухлинних препаратів. Це дозволить знизити їх негативні побічні ефекти на здорові тканини і органи та зберегти терапевтичний потенціал цих ліків щодо злоякісних клітин, а також частково подолати набуту стійкість цих клітин до хіміотерапії. Метою досліджень у дисертаційній роботі було вивчити біохімічні та клітинні механізми цито- тканинопротекторних властивостей антиоксидантів різної природи (похідні селену та вітамін В₅) *in vitro* та *in vivo* за їх комбінованої дії із доксорубіцином чи цисплатином.

Дисертаційну роботу виконано у рамках держбюджетної теми Інституту біології клітини НАН України «Механізми дії *in vitro* та *in vivo* нових сполук із проапоптотичною активністю, шляхи підвищення ефективності їх антineопластиичної дії та обґрунтування нових підходів у діагностиці та оцінці розвитку автоімунних і гематоонкологічних захворювань», та у рамках держбюджетної відомчої теми «Підвищення ефективності дії традиційних та експериментальних лікарських препаратів *in vitro* та *in vivo* шляхом їх іммобілізації на нанорозмірних носіях і поєднання з антиоксидантами». Частково роботу виконано у рамках теми кафедри біохімії Львівського національного університету імені Івана Франка «Створення і дослідження біологічного впливу функціонального продукту харчування на основі фітопрепаратів, що мають антиоксидантну та цукрознижувальну дію». Роботу було підтримано українсько-білоруськими проектами ДФФД-БрФФД «Використання редокс-модулюючих сполук для підвищення вибірковості дії нових протипухлинних препаратів» і «Редокс-модуляція системи глутатіону в пухлинних клітинах з різною чутливістю до хіміотерапії».

Мета і завдання досліджень сформульовані грамотно, вони побудовані з урахуванням результатів, які одержані іншими дослідниками і встановлених фактів, що дозволило автору визначити пріоритетні для дослідження напрямки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Основні наукові положення дисертації випливають з отриманих результатів експериментальних досліджень, вони ґрунтуються на глибокому аналізі та узагальненні одержаних результатів. Зокрема, дисертантою вперше з'ясовані основні механізми впливу антиоксидантів різної природи (селеніт натрію, селенометіонін, D-пантетин) на протипухлинну активність традиційних хіміотерапевтичних засобів (доксорубіцин, цисплатин). Обґрунтовано доцільність застосування окремих антиоксидантів в складі комбінованих хіміотерапевтичних схем для лікування мишей з експериментальними пухлинами. Вивчено способи подолання негативних побічних ефектів дії протипухлинних препаратів шляхом їхнього поєднання з досліджуваними антиоксидантами.

Встановлено, що спільне застосування селенометіоніну та D-пантетину в поєднанні з доксорубіцином знижує його негативні побічні ефекти на нормальні тканини організму тварин-пухлиноносіїв. Згадані антиоксиданти нейтралізують доксорубіцин-індуковані еритро-, лейкопенію, моноцитоз, а також нефротоксичність, знижуючи концентрацію креатиніну в крові мишей з лімфомою NK/Ly і меланомою B16F10/wt до рівня, характерного для здорових тварин. Лікування дослідних мишей лише доксорубіцином призводило до деструкції та порушення функцій внутрішніх органів і тканин, про що свідчить суттєве підвищення активності лактатдегідрогенази у

сироватці крові тварин-пухлиноносіїв. Водночас, спільне застосування цього антибіотика з антиоксидантами нормалізувало вищезгаданий показник до контрольного рівня. Доксорубіцин у поєднанні з селенометіоніном чи D-пантетином зменшували гостру кардіотоксичність, викликану ростом лімфоми NK/Ly та меланоми B16F10/wt, шляхом зниження аспартатамінотрансферазної активності та нормалізації коефіцієнта де Рітіса у сироватці крові мишей-пухлиноносіїв. Комбіноване лікування тварин-пухлиноносіїв доксорубіцином і антиоксидантами призводило до збільшення тривалості життя мишей з лімфомою NK/Ly та зменшення об'єму пухлини у мишей з меланомою B16F10/wt. Отримані дані свідчать про виражені тканинно-захисні властивості селенометіоніну та D-пантетину щодо організму мишей з експериментальними пухлинами та здатність цих антиоксидантів підвищувати терапевтичну ефективність доксорубіцину.

Таким чином, дисертантою вперше встановлено, що зниження негативних побічних ефектів протипухлинних препаратів зумовлене їх спільним застосуванням з селенометіоніном чи D-пантетином. Це пов'язане з їх здатністю покращувати селективність дії доксорубіцину та цисплатину, впливати на функціональний стан системи глутатіону та частково зменшувати доксорубіцин-індуковану продукцію активних форм Оксигену у псевдо нормальніх, але не в злойкісних клітинах.

Дисертантою розроблені нові схеми поліхімітерапії раку на основі доксорубіцину, селенометіону чи D-пантетину та проведені їх доклінічні дослідження на миших з експериментальними моделями пухлин.

Основні положення дисертації науково обґрунтовані, а їх достовірність підтверджена експериментальними даними і висновками, наведеними у дисертації та авторефераті.

Дисертацію викладено українською мовою на 216 сторінках, із них основна частина займає 156 сторінок. Загальна структура роботи побудована згідно вимог "Положення" ДАК України і містить усі необхідні структурні елементи: анотацію, список опублікованих праць за темою дисертації, зміст, перелік умовних позначень, вступ та розділи дисертації – огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, який містить 276 джерел. Робота містить 59 рисунків, 6 таблиць та 1 додаток.

На початку роботи представлена **аннотація** на українській (2-6 ст.) та англійській мовах (6-9 ст.), де стисло викладені основні результати досліджень, їх наукова новизна та практичне значення. Наводиться список публікацій дисертанта за темою дисертації, який включає 18 праць.

У **вступній частині** (21-29 ст.) дисертації автор дає літературний і власний науковий аналіз та обґрунтування вибраної теми, її актуальності, наводить зв'язок роботи з державною науковою тематикою, ставить мету і

завдання досліджень, розкриває наукову новизну одержаних результатів, їх практичне значення, висвітлює особистий внесок здобувача та апробацію матеріалів дисертації, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У розділі 1 «Огляд літератури» (30 – 52 ст.), який включає 7 підрозділів, дисерантка представила та глибоко проаналізувала літературні джерела, що стосуються основних побічних ефектів від застосування хіміотерапії та описала механізми, що лежать в основі їх виникнення. Здобувачка розкрила механізми виникнення множинної медикаментозної резистентності; показала особливості застосування антиоксидантних сполук у комбінованих схемах лікування онкозахворювань; представила короткі відомості про досліджувані протипухлинні препарати (доксорубіцин, цисплатин) та антиоксиданти (селеніт натрію, селенометіонін, D-пантетин).

Зібрани та цитовані наукові публікації викладені у списку використаних джерел дисертації. Наукова оцінка проведеного аналізу літературного огляду дає підстави вважати, що Козак Ю.С. добре володіє сучасною науковою літературою та здобула достатній обсяг знань з напряму досліджень за темою дисертаційної роботи.

Проведений аналіз розділу 2 «Матеріали і методи досліджень» (53-71 ст.) показав, що експериментальна частина дисертаційної роботи виконана *in vivo* та *in vitro*.

У роботі використано такі клітинні лінії: псевдонормальні – НЕК-293 (клітини нирки ембріона людини); NIH/3T3 (ембріональні фібробласти миші); HaCat (кератиноцити людини) та злоякісні з різними механізмами стійкості до ліків – HL-60/wt (гострий промієлоцитарний лейкоз людини) і її сублінії HL-60/vinc (надекспресія Р-глікопротеїну, резистентність до вінкристину) та HL-60/adr (надекспресія MRP1, резистентність до адраміцину); MCF-7 (аденокарцинома молочної залози людини); KB-3-1 (клітини карциноми шийки матки людини) і її сублінія KBC-1 (надекспресія Р-глікопротеїну, резистентність до колхіцину); B16F10/wt (високометастатична меланома миші). Крім того, у роботі використано лімфоцити клінічно здорових донорів.

У дослідженнях *in vivo* використовували статевозрілих мишей-самців ліній C57black/6 та Balb/c, яким інокулювали меланому B16F10/wt та лімфому NK/Ly, відповідно. Лімфому NK/Ly підтримували шляхом доочеревинного перевивання 0,2-0,3 мл асцитної рідини (20-30 млн клітин) на 7-8 день росту лімфоми від тварини-пухлиноносія до тварини-реципієнта лінії Balb/c. Прививання меланоми B16F10/wt пухлини здійснювали шляхом підшкірного інокулювання мишам лінії C57black/6 (C57/B16) суспензії пухлинних клітин, розведеної 1-кратним забуференим фізіологічним розчином (1xЗФР), у кількості 1 млн. для однієї тварини.

У процесі виконання роботи здобувачем використані сучасні методи біохімії, клітинної біології і цитохімії, такі як визначення активності ензимів та вмісту відновленого та окисненого глутатіону, культивування клітин *in*

vitro, світлова і флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія, прививання пухлин лабораторним тваринам, визначення показників пухлинного росту, лікування тварин-пухлиноносіїв, статистичне опрацювання результатів дослідження.

У розділі 3 представлені результати досліджень та їх обговорення (ст. 72-169). Дисертантою вдалося проаналізувати цитотоксичну активність протипухлинних препаратів (доксорубіцину, цисплатину) та антиоксидантних сполук (селеніту натрію, селенометіоніну, D-пантетину) щодо клітин ссавців, які характеризуються різними ступенями чутливості до хіміотерапії. Це, зокрема, лімфоцити клінічно здорових донорів, псевдонормальні клітини людини і миші, а також панель злоякісних ліній клітин, чутливих до хіміотерапії, та їх субліній з фенотипом ММР, які характеризуються надекспресією білків-транспортерів ліків. Було розраховано напівлетальні дози цисплатину і доксорубіцину щодо усіх вищезгаданих клітинних ліній, а також та нетоксичні або малотоксичні концентрації антиоксидантів.

Дисертантою було встановлено, що селеніт натрію, селенометіонін та D-пантетин проявляли виражений протекторний ефект щодо лімфоцитів клінічно здорових донорів та псевдонормальних клітин ліній NIH/3T3, НЕК-293 та HaCat, знижуючи на 10-20% цитотоксичну дію доксорубіцину і цисплатину. Водночас, антиоксиданти не впливали на активність протипухлинних препаратів щодо клітин лінії HL-60/wt гострого проміелоцитарного лейкозу людини. У нетоксичних дозах селеніт натрію, селенометіонін та D-пантетин статистично достовірно посилювали цитотоксичну дію доксорубіцину щодо лейкозних клітин з фенотипом ММР.

У роботі було показано, що вибірковість модуляторної дії антиоксидантів на псевдонормальні та злоякісні клітини безпосередньо корелює з їх АФО-інгібіторними властивостями. Таким чином, цитопротекторна активність селенометіоніну і D-пантетину на псевдонормальних клітинах людини пов'язана з їх здатністю пригнічувати продукцію АФО за дії ліків. На відміну від цього, захисна дія антиоксидантів відсутня щодо пухлинних клітин.

Дисертантою відзначено ключову роль досліджуваних антиоксидантів у регуляції функціонального стану системи глутатіону в пухлинних клітинах з різними механізмами стійкості до хіміотерапії. Виявлено важливе значення глутатіон-S-трансферази та глутатіонредуктази у модуляції медикаментозної резистентності, викликаної надекспресією Р-глікопротеїну.

Продемонстровано імуномодулюючі та тканинно-захисні ефекти селенометіоніну та D-пантетину в організмі мишей з лімфомою NK/Ly та меланомою B16F10/wt за їх застосування спільно з доксорубіцином. Встановлено, що за дії антиоксидантів пригнічувалася пухлино-індукована лімфопенія, нейтрофільоз та моноцитоз, викликаний доксорубіцином. Нормалізація лейкоцитарної формулі і кількості еритроцитів у крові, а також

стабілізація рівня креатиніну, аспартатамінотрансферазої та лактатдегідрогеназої активності є важливими факторами, що можуть поліпшити фізіологічний стан і прогноз лікування онкохворих шляхом нейтралізації негативного впливу на їхній організм як пухлинного росту, так і хіміотерапевтичного лікування.

Розділ 4 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» (ст. 170-184) містить аналіз одержаних результатів власних досліджень з обговоренням виявленіх змін основних показників. Проведено всезагальнючу оцінку терапевтичної та тканино-протекторної дії антиоксидантів різної природи на терапевтичний ефект протипухлинних препаратів щодо мишей з експериментальними моделями пухлин. В ході виконання даної дисертаційної роботи дисертанткою було переконливо показано, що основною причиною вибірковості дії антиоксидантних сполук є разюча різниця у функціонуванні системи глутатіону у нормальніх та пухлинних клітинах. Як наслідок, селенометіонін, напряму активуючи роботу глутатіонпероксидази, ефективно захищає нормальні тканини організму від оксидативного стресу, викликаного протипухлинним антибіотиком доксорубіцином. Особливість дії селенометіоніну визначає його міело- та нефропротекторна активність, що спостерігалася *in vivo*. В свою чергу, нормалізуючий вплив D-пантетину на ліпідний обмін та функціонування систем детоксикації печінки виявився більш ефективним при захисті печінки піддослідних тварин-пухлиноносіїв як від прогресії меланоми B16F10/wt, так і гепатотоксичної дії доксорубіцину. Дисертантка вважає, що як мінімум деякі з цитопротекторних ефектів D-пантетину, вперше виявленіх і описаних у цій роботі, зумовлені саме КоAлюванням протеїнів. Отримані дисертанткою результати вказують на доцільність поєднання обидвох антиоксидантів у хіміотерапії пацієнтів з лімфолейкозами та меланомами, що дозволить водночас посилити терапевтичну дію ліків, та знизити їх побічні ефекти на організм онкохворих.

Оцінюючи матеріали цього розділу необхідно відзначити наукову глибину проведеного дисертанткою аналізу отриманих даних. На основі вивчення матеріалів цього розділу можна стверджувати, що викладені в дисертаційній роботі результати достатньо науково опрацьовані у порівнянні з даними літератури. Аналіз результатів власних досліджень та їх узагальнення дало можливість здобувачці зробити науково-обґрунтовані висновки, які випливають з представленого в дисертації фактичного матеріалу.

Шість висновків, що наведені у дисертації (ст. 185-186) та авторефераті (ст. 14-15) сформульовані з врахуванням критеріїв вірогідності, науково-обґрунтовані та достатньо повно висвітлюють одержані результати та основні положення дисертації.

Список використаних джерел (ст. 187-212) містить 276 публікацій.

Є один додаток (ст. 213-216), що включає список наукових праць здобувача.

Повнота викладу результатів досліджень в опублікованих працях.

Детальний аналіз дисертаційних матеріалів, проведений у період їх рецензування, свідчить, що результати наукової роботи Козак Юлії Сергіївни є підсумком завершених досліджень, які впродовж періоду їх виконання всебічно аналізувалися і висвітлені у 18 наукових працях, серед яких 6 статей у міжнародних і вітчизняних фахових періодичних виданнях та 12 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій. Варто відзначити, що крім 2-х тез, усі праці опубліковані англійською мовою. Основні положення дисертації науково аргументовані та в повній мірі відображені в наукових статтях.

Дисертація та автореферат оформлені на належному науковому рівні, написані державною мовою. Автореферат дисертації за змістом ідентичний дисертаційній роботі та висвітлює основні її положення.

Висловлюючи позитивну оцінку дисертаційної роботи в цілому, необхідно зробити окремі **зауваження**, що були виявлені в період її аналізу:

1. Перелік умовних позначень дуже розширений, складає 3 сторінки, вважаю, що у ньому повинна бути лише специфічна термінологія та маловідомі скорочення, а загальноприйнята термінологія (EDTA, GPx, GR, GSH, GSSG, O₂⁻, H₂O₂) є зайвою.
2. Незрозуміло чому схема досліджень впливу селенометіоніну і D-пантетину на терапевтичну активність доксорубіцину в організмі мишей з лімфомою NK/Ly (133 ст.) та меланомою B16F10/wt (154-155 ст.) представлені розділі 3 «Результати досліджень та їх обговорення», а не у розділі 2 «Матеріали і методи дослідження».
3. У п. 3.3.1. позначення груп тварин на рисунках 3.38 і 3.39 не співпадають із представленими у схемі досліджень на рис. 3.37. Зокрема, у схемі досліджень група 2 – це миші з лімфомою неліковані, в той час як у наступних рисунках ці тварини представлені як контрольні. Аналогічно у п. 3.3.2. позначення груп тварин на рис. 3.46 не співпадають з позначеннями груп у схемі досліджень на рис. 3.45.
4. У дослідженнях мишей з меланомою B16F10/wt, яких лікували доксорубіцином у комплексі з антиоксидантами, зразки крові для біохімічних і цитоморфологічних досліджень відбирали на 30-й день після інокуляції пухлини, у той час як забір крові у тварин з меланомою, яких не лікували, проводили на 22-й день після інокуляції пухлини. Можливо доцільно було б провести дослідження показників крові у лікованих тварин також на 22-й день, крім 30-го.

У процесі аналізу дисертаційної роботи також виникли деякі **запитання** до здобувача:

- В чому полягає відмінність цитотоксичної дії доксорубіцину та цисплатину?
- Чим можна пояснити вибірковість дії антиоксидантів, які досліджували, на лімфоцити клінічно здорових донорів, псевдонормальні та злоякісні

- клітини?
- Чому цитопротекторна активність антиоксидантів, які застосовувалися у комплексі з доксорубіцином, щодо псевдонормальних клітин та лімфоцитів здорових донорів спостерігалася лише в мінімальній дозі?
 - Яка відмінність механізму нефропротекторної дії застосованих антиоксидантів селенометіоніну і D-пантетину?

Виявлені недоліки та упущення суттєво не впливають на науковий і методичний рівень дисертаційної роботи, а тому не зменшують теоретичного і практичного значення одержаних результатів та дисертації в цілому.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи й автореферату Козак Юлії Сергіївни «Механізми дії антиоксидантів у модуляції терапевтичного ефекту протипухлинних препаратів на моделях експериментальних пухлин у миші» необхідно відзначити, що дисертація є самостійною завершеною науковою працею, в якій експериментально підтверджено перспективність спільного застосування протипухлинних препаратів із антиоксидантними сполуками, що дозволить суттєво збільшити їхню терапевтичну ефективність і знизити побічні ефекти ліків.

Дисертаційна робота за актуальністю тематики досліджень, обсягом і науково-методичним рівнем їх виконання, новизною, практичним значенням і науковою обґрунтованістю одержаних результатів та викладених положень відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013 року, що ставляється до кандидатських дисертацій, а її автор Козак Юлія Сергіївна заслуговує здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

Офіційний опонент

Доктор біологічних наук, ст. н. співробітник,
заступник директора з наукової роботи
Інституту біології тварин НААН,
завідувач лабораторії біохімії
адаптації та онтогенезу тварин

R. Я. Іскра

Підпис Р. Я. Іскри засвідчує:
головний фахівець ВК
Інституту біології тварин НААН, канд. с.-г. наук



I. В. Невоструєва

22.05.2019 р.