

До разової спеціалізованої ради ДФ 35.051.110
Львівського національного університету
імені Івана Франка
м. Львів, вул. Університетська, 1

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Ільків Марти Володимирівни
за темою: «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з
ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями», яка представлена
на здобуття наукового ступеня доктора філософії
з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертації. Актуальність дисертаційної роботи Ільків М.В. обґрунтована необхідністю вивчення механізмів дії протипухлинного похідного тіазолу БФ1 у вільному статі та у комплексі з поліетиленглікольвмісними полімерними наноносіями (ПЕГ-ПН), які використовують з метою покращення його розчинності і терапевтичної ефективності.

Різноманітність форм злякисних новоутворень, їх морфологічний і клінічний перебіг, а також різна реактивності організму, диктує необхідність індивідуального підходу до лікування кожного хворого, пошуку нових методів, технологій та лікарських препаратів. Похідні тіазолу є перспективними протипухлинними сполуками, для яких характерний широкий спектр біологічної дії. Однак, як і більшість хіміотерапевтичних засобів, ця сполука погано розчиняється як у воді, так і в полярних розчинниках, що може потенційно обмежити її ефективність і можливість використання. Тому для досягнення кращої терапевтичної ефективності у лікуванні онкологічних захворювань розробляють системи доставки ліків на основі полімерних наноносіїв, які демонструють хорошу фармакокінетику, точне націлювання на пухлинні ураження, зменшують побічні ефекти хіміотерапії та знижують резистентність до ліків. Утворення таких комплексних протипухлинних препаратів є важливим етапом у використанні їх у медичній практиці для лікування онкологічних захворювань. Тому, вибір теми дослідження цілком виправданий, має важливе теоретичне і практичне значення, а актуальність роботи не викликає сумніву.

Зв'язок дисертаційної роботи з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біофізики та біоінформатики Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках науково-дослідної теми «Механізми подолання резистентності та підвищення ефективності протипухлинної дії похідних тіазолу в комплексі з

нанорозмірними полімерними носіями» (2019-2021 рр., № держреєстрації 0119U002201).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації. Дисертаційне дослідження Ільків М.В. виконано на достатньо високому методичному рівні з використанням комплексу сучасних методів експериментальних досліджень, зокрема біофізичних, цитологічних, біохімічних, фізіологічних. Основні наукові положення та висновки, сформульовані в дисертації, логічно випливають із одержаних результатів, ґрунтуються на глибокому аналізі та узагальненні одержаних результатів. Вони відповідають поставленій меті та завданням дослідження.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 5.04, Microsoft Office Excel 2010. Досліди проводили як мінімум у п'яти паралелях в кожному варіанті, з яких розраховували середнє значення (M) та середню похибку (m), яку вираховували за середнім квадратичним відхиленням « σ ». Статистичну достовірність різниці між контрольними та дослідними групами визначали за критерієм Стьюдента, а також однофакторним дисперсійним аналізом («One-way ANOVA») із використанням поправки Бонферроні (Bonferroni test). Критичні рівні достовірності у дослідженнях відповідали значенням 0,05; 0,01 і 0,001.

Основні наукові результати, одержані автором, та їхня новизна. Дисертантка отримала значний обсяг наукових результатів, що характеризуються новизною.

Уперше створено комплекси протипухлинного похідного тіазолу БФ1 та полімерних ПЕГ-вмісних наноносіїв для покращення доставки та розчинності досліджуваного препарату.

Уперше експериментально доведено, що БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН є більш цитотоксичною до певних пухлинних клітин тварин та людини в порівнянні з некон'югованою речовиною та Доксорубіцином. Вільні ПЕГ-ПН та їх комплекси з БФ1 не були цитотоксичними щодо непухлинних клітин ліній НЕК293 та НІН3Т3.

Уперше доведено, що комплексоутворення БФ1+ПЕГ-ПН, порівняно з некон'югованою речовиною, зумовлюють посилене генерування АФО, активацію процесів ПОЛ, а також зростання супероксиддисмутазної активності та зниження глутатіонпероксидазної і каталазної активності.

Уперше встановлено, що тільки у комплексі з ПЕГ-ПН похідне тіазолу БФ1 зумовлює зниження мітохондріального мембранного потенціалу клітин лімфоми і, як наслідок, активацію процесів FCCP-стимульованого клітинного дихання.

Уперше зафіксовано відсутність впливу ПЕГ-ПН та його комплексів з БФ1 на вільнорадикальні процеси, ПОЛ, активність антиоксидантних ферментів у клітинах печінки мишей-пухлиноносіїв NK/Ly.

Уперше на експериментальній *in vivo* моделі асцитної лімфоми NK/Ly мишей встановлено, що ПЕГ-ПН Th1 посилює протипухлинну дію похідного тіазолу БФ1 та знижує токсичний вплив на клітини крові, які виникли під час розвитку лімфоми.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів дослідження. Теоретична цінність наукових результатів представленої роботи полягає у з'ясуванні механізмів цитотоксичної дії похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями. Дисертантка запропонувала спосіб покращення розчинності та доставки похідного тіазолу БФ1 за допомогою ПЕГ-вмісних полімерних носіїв для посилення протипухлинного ефекту та ефективного терапевтичного використання досліджуваної речовини у майбутніх доклінічних та клінічних дослідженнях.

Отримані дисертанкою результати досліджень будуть впроваджені в навчальний процес та наукову роботу кафедр біофізики та біоінформатики і фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка. Методичні та експериментальні розробки будуть використовувати студенти, аспіранти та наукові співробітники для подальших наукових досліджень.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій. Основні наукові результати, положення та висновки дисертації пройшли апробацію на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях, а також на наукових семінарах кафедри біофізики та біоінформатики та на щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка. За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 6 статей у фахових наукових виданнях, які належать до міжнародної наукометричної бази Scopus, а також у 8 тезах доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях.

Сукупність усіх публікацій відображає викладені в дисертації результати дослідження, що відповідає вимогам п. 8, 9 вимог до присудження ступеня доктора філософії «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44.

Відомості про дотримання академічної доброчесності. У наукових публікаціях і дисертаційній роботі Ільків Марти Володимирівни на тему «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними

наноносіями» не виявлено ознак академічного плагіату, фальсифікації чи інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертанткою представленого наукового дослідження. Текст є оригінальним, всі цитати коректно позначені та вказані в списку використаних джерел.

Структура та зміст дисертації. Дисертаційна робота відповідає вимогам щодо оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40.

Дисертацію викладено на 174 сторінках українською мовою, основна частина складає 126 сторінок, проілюстрована 45 рисунками та 6 таблицями. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатку. До списку літератури входять 181 найменування, з них 166 – латиницею.

Дисертаційна робота розпочинається з анотації, ключових слів і списку публікацій за темою дисертації, які написані державною та англійською мовами. В анотації стисло представлені основні результати дослідження із зазначенням наукової новизни і практичного значення.

У **«Вступі»** (с. 20-26) обґрунтовано актуальність обраної тематики, сформульовано мету та завдання дослідження, розкрито наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, описані методи досліджень, висвітлено особистий внесок здобувача та апробацію результатів, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У першому розділі дисертації **«Огляд літератури»** (с. 27-53) дисертантка глибоко проаналізувала літературні джерела, що характеризують роль активних форм Оксигену, антиоксидантної системи захисту та клітинного дихання при онкологічних станах. Автором проведений глибокий аналіз літературних даних щодо протипухлинних властивостей похідних тіазолу. Обґрунтовано використання наноносіїв для підвищення ефективності протипухлинних препаратів. Розглянуто різновиди наноносіїв та їх коротку характеристику, а також шляхи підвищення ефективності доставки протипухлинних речовин за допомогою полімерних наноносіїв.

Наукова оцінка проведеного аналізу літературного огляду дає підстави вважати, що Ільків М.В. добре володіє сучасною науковою літературою та здобула достатній обсяг знань з напряму досліджень за темою дисертації.

У другому розділі **«Матеріали та методи дослідження»** (с. 54-69) достатньо детально описані методи досліджень, які відповідають меті та завданням дисертаційної роботи. Представлена інформація про сполуки, які використовували в роботі, зокрема розчин похідного тіазолу (БФ1), синтез якого здійснено на кафедрі органічної хімії Львівського національного університету імені Івана Франка; ПЕГ-вмісні полімерні носії (ПЕГ-ПН), синтез

яких здійснено на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська Політехніка»; препарат Доксорубіцин – антрацикліновий антибіотик, що застосовується в хіміотерапії. Надана характеристика культур пухлинних клітин, зокрема: клітинних ліній гліобластоми людини U251, T98G та U373, клітинної лінії гепатокарциноми людини HepG2, клітинної лінії промієлоцитарного лейкозу людини HL-60 та клітинної лінії гліоми щурів C6, а також псевдонормальних клітинних ліній нирки ембріона людини NEK293 та фібробластів миші NIH3T3. Дисертанткою описані методи, що були використані у дослідженнях, такі як визначення цитотоксичної активності досліджуваних сполук, прививання експериментальної моделі лімфоми NK/Ly миші, видалення печінки у мишей-пухлиноносіїв, дослідження змін в ультраструктурі пухлинних клітин методом трансмісійної електронної мікроскопії, визначення вмісту супероксидного радикалу в клітинах печінки, визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та активності ензимів антиоксидантного захисту, визначення вмісту активних форм Оксигену та вимірювання мембранного потенціалу мітохондріальної мембрани, який реєстрували методом флуоресцентної мікроскопії, визначення швидкості дихання клітин лімфоми, що реєстрували за допомогою полярографічного методу та 6-клітинного респірометра RC650, цитологічні дослідження крові, а також статистичний аналіз отриманих результатів.

У третьому розділі «**Результати досліджень та їх обговорення**» (с.70-121) представлені результати досліджень цитотоксичної дії похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями на пухлинні та непухлинні клітини *in vitro*. Методом електронної мікроскопії досліджувалися зміни ультраструктури пухлинних клітин, що дало змогу визначити ступінь впливу антиракових речовин на внутрішню будову клітини. Досліджено вплив похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН на генерування активних форм Оксигену, рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів та активність ензимів антиоксидантного захисту, зміну швидкості дихання та мітохондріального мембранного потенціалу клітин лімфоми NK/Ly. Крім цього, досліджено вільнорадильних процесів та активності ензимів системи антиоксидантного захисту у гомогенатах печінки мишей за дії похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-ПН. Досліджено протипухлинну дію БФ1 і його комплексу з ПЕГ-вмісними полімерними носіями *in vivo* на експериментальній моделі лімфоми Немет-Келнера у мишей. Отримані результати досліджень висвітлено у таблицях та рисунках.

Четвертий розділ «**Аналіз та узагальнення результатів дослідження**» (с.122- 143) містить аналіз одержаних результатів власних досліджень з обговоренням виявлених змін основних досліджуваних показників. У цьому розділі дисертантка ставить проблемні запитання, на які дає науково

обґрунтовані відповіді, що підтверджуються отриманими результатами. Дисертантка робить узагальнюючий висновок, що похідне тіазолу БФ1 є перспективною протипухлинною речовиною, яка проявляє високу цитотоксичність щодо певних ліній пухлинних клітин і не є цитотоксичною до здорових клітин організму. Утворення комплексів з ПЕГ-вмісними полімерними носіями дозволило покращити розчинність БФ1, наслідком чого є її підвищена проникність в пухлинні клітини та покращений антинеопластичний ефект.

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 співставленні з даними літератури. Проведений аналіз результатів власних досліджень та їхнє узагальнення у цьому розділі дало змогу дисертантці зробити науково-обґрунтовані висновки, які впливають з представленого в дисертації фактичного матеріалу.

Сім **висновків** (с.144-145), що наведені у дисертації, узагальнюють і достатньо повно висвітлюють одержані результати та основні положення дисертації.

Список використаних джерел (с.146-169) оформлений за встановленим стандартом, містить 181 публікацію, з них 82% – за останні 10 років.

У Додатку А (с.170-174) представлено список публікацій здобувача та відомості про апробацію результатів дисертації.

Зауваження до дисертації. Детальний аналіз дисертаційної роботи Ільків М.В. свідчить, що наукова робота є підсумком завершених досліджень, які впродовж періоду їх виконання всебічно аналізувалися. Основні положення дисертації науково аргументовані та в повній мірі відображені в наукових публікаціях. Висловлюючи позитивну оцінку дисертаційної роботи в цілому, необхідно зробити окремі зауваження, що були виявлені в період її аналізу:

1. У підрозділі 2.1. «Сполуки, які використовували в роботі», на мій погляд, слід було описати процес утворення комплексів Th2, Th4 і Th6 (крім таблиці 2.1.), оскільки лише з результатів досліджень можна зрозуміти, що являють собою ці комплекси.
2. Незрозуміло чому всі препарати у дослідженнях на мишах вводили 10 днів після інокуляції пухлини, а доксорубіцин – 8 днів?
3. Не зовсім зрозуміло таке: на ст. 112 вказано, що тривалість життя нелікованих мишей з лімфомою НК/Лу становила 19 днів після інокуляції пухлини, а далі по тексту (на 114 ст.) – маса нелікованих мишей-пухлиноносіїв збільшилася за 27 днів на майже 20% з дня інокуляції.
4. У тексті дисертації зустрічаються деякі технічні помилки та неточності.

У процесі рецензування роботи виникли деякі *запитання*:

1. Яким чином похідне тіазолу БФ1 спричиняє генерацію АФО (с.85) у клітинах лімфоми?
2. За рахунок чого вільний ПЕГ-ПН Th5 зумовлював підвищення рівня АФО у клітинах лімфоми (с.85) та ГПЛ – у гепатоцитах мишей з лімфомою NK/Ly (с.105)?
3. Чому комплекси похідного тіазолу з ПН, а не вільна БФ1 підвищували FCCP –стимульоване дихання?
4. Як можна пояснити, що комплекс Th2 знижує мембранний потенціал мітохондрій клітин лімфоми, проте не впливає на швидкість FCCP-стимульованого клітинного дихання?
5. Які на сьогодні лікарські засоби протипухлинної терапії у комплексі з ПН вже застосовуються у медицині?

Однак, виявлені недоліки та упущення суттєво не впливають на науковий і методичний рівень дисертаційної роботи, а тому не зменшують теоретичного і практичного значення одержаних результатів.

Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Ільків Марти Володимирівни на тему «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями» є завершеною науковою працею, що за актуальністю проблеми, методичними підходами, обсягом, ґрунтовністю аналізу та інтерпретацією отриманих даних, повнотою викладу принципів наукових положень, науково-теоретичним і практичним значенням та кількістю публікацій повністю відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 р. «Порядок присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а дисертантка, з урахуванням виконання у повному обсязі освітньої складової освітньо-наукової програми та індивідуального плану наукової роботи, заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент:

Доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри фізіології людини і тварин
Львівського національного університету
імені Івана Франка

Руслана ІСКРА