

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

## **ВІДГУК**

офіційного опонента, доктора біологічних наук, старшого дослідника,  
завідувача відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини  
НАН України **Стасика Олега Володимировича**  
на дисертацію **Ільків Марти Володимирівни** на тему  
**«Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі  
з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями»,**  
подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії  
з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Ознайомившись із дисертаційною роботою Ільків Марти Володимирівни вважаю, що відповідна праця є **сучасним науковим дослідженням в галузі біології**, що ставить за мету дослідження цитотоксичної дії нової сполуки – похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями.

**Актуальність теми дослідження:** Незважаючи на стрімкий прогрес медицини, неоплазії залишаються однією із основних причин смертності у всьому світі. Низька ефективність лікування онкозахворювань часто пов'язана з їх генетичною гетерогенністю, розвитком резистентності пухлинних клітин до хіміотерапевтичних агентів та надмірною поліорганною токсичністю останніх і недостатньою селективністю щодо нормальних та злоякісно трансформованих клітин. Тому пошук нових ефективних цільових методів лікування та удосконалення уже наявних терапевтичних ліків, що застосовують у клінічній практиці, наприклад шляхом дизайну систем доставки лікарських засобів (СДЛ), залишається актуальним напрямом сучасних досліджень у галузі біомедицини. Таким чином, завдання дисертаційної роботи Ільків М.В. є вкрай актуальними.

**Структура та обсяг дисертації** Дисертація містить наступні розділи: «Анотація», "Вступ", "Огляд літератури", "Матеріали та методи дослідження", "Результати та їх обговорення", "Аналіз та узагальнення результатів", "Висновки" та "Список використаних джерел". Дисертацію викладено на 174-ох сторінках друкованого тексту. Робота містить 45 рисунків, 6 таблиць та 1 додаток. Список використаної літератури налічує 181 джерело.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалась 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) та у співпраці з іншими науково-дослідними установами.

**Метою дослідження** було встановити механізми протипухлинної дії *in vitro* та *in vivo* похідного тіазолу БФ1 (N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксамід), яке в попередніх дослідженнях виявило значну протипухлинну дію щодо низки злоякісних клітинних ліній. Однак, як і багато інших низькомолекулярних гетероциклічних інгібіторів, ця сполука є погано розчинною у воді та полярних розчинниках, що значно обмежує її потенційне практичне використання. Тому за мету було поставлено проаналізувати комплекси БФ1 з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями (ПЕГ-ПН), які потенційно мали б виявляти покращену розчинність та проникність в таргетні клітини пухлин, тобто потенційно покращені фармакокінетичні властивості. Мета та 7 завдань роботи сформульовані детально, чітко і зрозуміло. Робота є комплексною та включає дослідження цитотоксичності та механізмів дії отриманий кон'югатів похідного тіазолу *in vitro* на різних клітинних моделях, а також *in vivo* на моделі тварин із лімфомою Немет-Келнера (NK/Ly).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Не викликають сумніву наукова новизна роботи та її важливе теоретичне та практичне значення.

Так, вперше експериментально підтверджено, що БФ1-ПН (в комплексі з трьома альтернативними ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями) є більш цитотоксичним щодо певних пухлинних клітин тварин та людини в порівнянні з некон'югованим БФ1 та доксорубіцином, як стандартом хемотерапевтичної сполуки. При цьому вільні ПЕГ-ПН та їх комплекси з БФ1 не були цитотоксичними щодо псевдо нормальних клітин ліній НЕК293 та НІН3Т3. Показано, що у порівнянні із вільним БФ1, БФ1-ПН посилюють генерування активних форм кисню (АФО) та активують процеси порекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в пухлинних клітинах, а також активують апоптоз та некроз. Також встановлено, що БФ1-ПН підвищують активність супероксиддисмутази (СОД), але зниження активності глутатіонпероксидази (ГПО) та каталази (КАТ). При цьому кон'югований БФ1-ПН, але не БФ1, викликає зниження мембранного потенціалу мітохондрій клітин лімфоми, але не у гепатоцитах мишей-пухлиноносіїв. На експериментальній моделі *in vivo* асцитної лімфоми НК/Лу мишей вперше показано, що БФ1-ПН Th1 посилює протипухлинну дію БФ1 та знижує токсичні прояви щодо клітин крові, які виникають під час розвитку лімфоми. На основі одержаних результатів запропоновано механістичну схему цитотоксичної дії похідного тіазолу БФ1 в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними носіями.

Слід відзначити **високий методичний рівень роботи**. У роботі були використані різноманітні та адекватні відносно поставлених завдань сучасні та класичні методи клітинної біології, біофізичні (спектрофотометричний та полярографічний) методи, електронна та флюоресцентна мікроскопія, цитологічні та біохімічні, а також експериментальні підходи *in vivo* та методи математичної статистики.

**Практичне значення наукових результатів роботи** полягає в експериментальному обґрунтуванні способу покращення розчинності та доставки похідного тіазолу БФ1 за допомогою ПЕГ-вмісних полімерних носіїв для посилення селективного протипухлинного ефекту. Також важливою є встановлена відсутність значної токсичності досліджуваних некон'югованих ПЕГ-ПН та їх комплексів з БФ1 на псевдонормальні клітинні лінії та гепатоцити мишей.

**Використання результатів роботи.** Отримані результати дисертаційного дослідження можуть бути впроваджені в навчальний процес та наукову роботу кафедр біофізики та біоінформатики і фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у таких навчальних дисциплінах як «Біофізика», «Неоплазія», «Біоенергетика» та «Цитологія і гістологія».

**Особистий внесок здобувача** в отриманні та обґрунтуванні наукових та практичних результатів, що викладені в дисертаційній роботі, не викликає сумніву. Дисертантка брала безпосередню участь у плануванні поставлених експериментальних задач та виконанні основної частини досліджень, а також у підготовці публікацій за темою дисертації. У роботі наводяться необхідні посилання на вклад інших співавторів публікацій. Важливо відзначити, що синтез похідного тіазолу БФ1 виконано к. х. н, доц. Остап'юком Ю.В. (Львівський національний університет імені Івана Франка). Синтез БФ1-ПН виконано групою під керівництвом д. х. н., проф. Заїченка О.С. і д. х. н., доц. Мітіної Н.Є. (Національний університет "Львівська політехніка").

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей наукових конференцій. Загалом за темою дисертації опубліковано 12 наукових робіт, що охоплюють усі розділи дисертації, з яких 6 статей у фахових вітчизняних наукових виданнях, які належать до міжнародної наукометричної бази Scopus (з яких у 5-ти здобувач є першим автором), та 6 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях. Слід зазначити при цьому, що варто було б спробувати опублікувати результати роботи у міжнародному виданні із імпаکت-фактором, однак це непросте завдання, пов'язане із рядом складностей.

**Відомості про дотримання академічної доброчесності.** У дисертаційній роботі М.В. Ільків «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями» не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фальсифікації та інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертаційного дослідження.

Відзначаючи серйозний науковий та методологічний рівень роботи, **до дисертаційної праці виник ряд зауваг та запитань:**

До **Анотації та Вступу** зауваг немає.

**Огляд літератури.** В огляді літератури ґрунтовно описано системи клітини, що відповідають за антиоксидантний захист, зокрема характерні зміни у зміни у злоякісних клітинах, метаболічні зміни останніх пов'язані з енергетичним метаболізмом, зокрема аберантну регуляцію гліколізу та глутамінолізу у пухлинних клітинах, а також зміни у регуляції функцій мітохондрій. В Огляді також охарактеризовано протипухлинні властивості похідних тіазолу та використання різних типів наноносіїв для підвищення ефективності протипухлинних препаратів. Огляд є добре написаним та чітко викладеним, хоча інколи занадто схематичним, а деякі важливі особливості полімерних наноносіїв, як наприклад їх імуногенність, не розглянуто.

**Стор. 28.** «*Інші джерела АФО включають пероксисоми (де супероксид і  $H_2O_2$  генеруються ксантиноксидазою в пероксисомальному матриксі); Основним джерелом перекису гідрогену в пероксисомах є ферменти катаболізму жирних кислот. Також на Рис. 1.1. ксантиноксидаза показана як позапероксисомний ензим.*

У розділі **Матеріали і методи досліджень** детально описані використані у роботі методичні підходи досліджень *in vitro* та *in vivo*.

**Результати досліджень та їх обговорення.**

1. У тексті зустрічаються **невдалі вирази**, напр. (Стор. 70) «*похідне тіазолу БФ1 має **тканинну специфічність** щодо окремих ліній пухлинних клітин*».

2. **Стор. 70** «*вивчали цитотоксичну активність некон'югованого похідного тіазолу БФ1 та його комплексів з ПЕГ-вмісними полімерними носіями на клітинні лінії гліобластоми людини ліній U251, T98G, U373, гепатокарциноми людини лінії HepG2, гліоми щура лінії C6 та промієлоцитарного лейкозу людини лінії HL-60.*» Потрібно пояснити, чому саме ці модельні клітинні лінії раку використані в роботі.

3. **Стор. 75 Підсумок 3.1.** «*Досліджувані комплекси БФ1 з ПЕГ-ПН виявили широкий спектр вибіркового інгібування росту пухлинних клітин людини та щура різного тканинного походження.*» Нема висновку щодо цитотоксичності БФ1 та його комплексів щодо клітин гліом, для яких сполука та похідні виявились малоефективними з IC50 понад 7 мкМ.

4. **Розділ 3.2** Не аргументовано, чому електронномікроскопічне дослідження БФ1 та БФ1-ПН проводили на клітинах лімфоми миші, для яких не відоме IC50, а не скажімо клітинах гепатокарциноми, чи лейкозу миші HL-60, які були чутливими до дії відповідних препаратів *in vitro*.

5. **Рис. 3.9 – 3.10** – Похідне від попереднього запитання: чому саме єдина концентрація БФ1 та похідних 10 мкМ використовувалась у експериментах з індукції АФО?

6. **Рис. 3.10** – запитання: чи може зростання АФО на 30 %, як у випадку дії БФ1 викликати апоптоз клітин? З даних літератури, яке зростання викликають інші протипухлинні препарати, дія яких опосередковується АФО.

Запитання до **Розділу 3.2** – Чому не використали інгібітор (скавенджер) АФО, напр. N-acetyl-cysteine (НАС), як негативний контроль при дії БФ1 та похідних?

7. **Розділ 3.5 . Підсумок «БФ1 та її комплекси з ПЕГ-ПН зумовлюють зростання активності СОД та зменшення активності КАТ і ГПО у клітинах лімфоми.»** Чи є гіпотеза як можна пояснити такий дивергентний (різнонаправлений) вплив БФ1 та похідних на різні ферменти АОС?

8. **Розділ 3.9. «Відомо, що лімфома NK/Лу є зручною та широко розповсюдженою експериментальною моделлю асцитної пухлини, яку використовують для дослідження антинеопластичної активності різноманітних протипухлинних агентів.»** **Запитання:** Чи настільки зручною є ця модель, оскільки її важко культивувати (проліферувати) *in vitro*?

9. **Розділ 3.9. Рис. 3.29. Запитання:** Чому *in vivo* аналізували саме комплекс БФ1-ПН Th2, а не скажімо Th6, який напр. достовірно збільшує рівень продуктів ПОЛ у клітинах лімфоми?

10. **Розділ 3.9. «Похідне тiazолу БФ1 (10 мг/кг) та його комплекс з ПЕГ-ПН Th2 здатні пригнічувати розвиток лімфоми, що супроводжується збільшенням тривалості життя тварин, але без впливу на масу пухлини. Яким чином можна пояснити терапевтичний ефект БФ1 «без впливу на масу пухлини»?**

**Аналіз та узагальнення результатів.** Розділ містить ґрунтовний та деталізований порівняльний аналіз отриманих результатів з даними літератури. **Заувага:** «досліджувані комплекси БФ1+ПЕГ-ПН були, як і вільна БФ1, тканино специфічними», - коректніше говорити «специфічними щодо окремих клітинних ліній різного органного походження»

**Висновки.** Зауваження щодо висновку №3 «Зареєстровано збільшення вмісту активних форм Оксигену в клітинах лімфоми за впливу БФ1 та її комплексів з ПЕГ-ПН, які ймовірно є основними тригерами цитотоксичної дії досліджуваного похідного тiazолу.» видається занадто категоричним, - «одним із можливих тригерів».

**Загальні зауваги.** У роботі значна увага приділяється встановленню механізму впливу сполуки БФ1 та кон'югатів з PEG БФ1-ПН на злоякісні клітини. Також у загальній схемі, яка узагальнює отримані результати щодо механізму дії БФ1 та похідних (Рис. 4.1.), вказується ендоцитоз, як імовірний спосіб проникнення комплексів з ПН у клітину. Однак ні скавенджерів АФО, ні інгібіторів ендоцитозу в експериментах *in vitro* для підтвердження запропонованого механізму дії досліджуваних сполук у роботі використано не було. Також доцільно було б приділити більше уваги експериментальним доказам механізму загибелі клітин за дії БФ1 та БФ1-ПН (апоптоз, некроз, фероптоз, автофагія тощо). Також недостатньо аргументовано в Результатах чи їх Аналізі, виходячи із даних *in vitro*, чому саме комплекс БФ1 з полімерним носієм Th1 було обрано для аналізу *in vivo*.

Підсумовуючи, висловлені зауваження не зменшують загальну актуальність, новизну результатів та науково-практичну цінність роботи, та її **відповідність вимогам до дисертацій на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.** Обсяг виконаних досліджень та їхня якість є цілком достатніми для формулювання та обґрунтування наведених висновків. Вважаю, що дисертаційна робота Ільків Марти Володимирівни на тему: **«ЦИТОТОКСИЧНА ДІЯ ПОХІДНОГО ТІАЗОЛУ В КОМПЛЕКСІ З ПЕГ-ВМІСНИМИ ПОЛІМЕРНИМИ НАНОНОСІЯМИ»** відповідає сучасним вимогам до оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертацій», а також затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. № 44 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а здобувач, **Ільків Марта Володимирівна**, цілком заслуговує на присудження наукового ступеня **доктора філософії** з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Завідувач відділу  
сигнальних механізмів клітини  
Інституту біології клітини НАН України,  
доктор біологічних наук, старший дослідник

Стасик О. В.