

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, доцента, професора кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Київського національного університету імені Тараса Шевченка **Цимбалюк Ольги Володимирівни** 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»

**Актуальність теми дисертації.** Натепер рак є другою після серцево-судинних захворювань причиною смерті людей та за прогнозами ВООЗ у найближчі десятиріччя спостерігатиметься подальше швидке зростання захворюваності на злоякісні новоутворення. Хоча локалізовані пухлини на перших етапах розвитку можуть бути з високою ймовірністю вилікувані хірургічно або радіотерапевтично, у випадку метастатичних пухлин головним методом лікування є хіміотерапія. На жаль, сучасні засоби хіміотерапії не можна вважати високоефективними, адже, по-перше, п'ятирічна відносна виживаність пацієнтів з віддаленими метастазами наразі складає менше 30%, по-друге, застосовані хіміопрепарати не є селективними щодо новоутворень і спричиняють значний токсичний вплив на здорові тканини, а також, по-третє, явище резистентності пухлин вимагає використання комбінованих препаратів, які також не завжди є ефективними. Тож актуальність обраного Мартою Володимирівною Ільків напрямку наукового дослідження обумовлена надзвичайною важливістю розробки і оптимізації стратегії хіміотерапевтичного лікування злоякісних новоутворень.

Гетероциклічні сполуки похідні тіазолу є надзвичайно перспективними сполуками, які активно використовуються для розробки фармакотерапевтичних препаратів з різною біологічною активністю. Так, натепер вже отримали схвалення FDA та ЕМА антимікробні, протизапальні, противиразкові, противірусні, а також і протипухлинні (тіазофурин, дазатиніб та блеоміцин) лікарські засоби на основі тіазолів.

Як уже згадувалося, великою проблемою хіміотерапії новоутворень є не вибірковість дії препарату щодо клітин організму та побічні ефекти на здорові тканини. Найбільш перспективною стратегією подолання цих недоліків вважається використання способів спрямованої доставки активної субстанції до місця пухлини. Тож варто підкреслити надзвичайно важливий аспект актуальності дисертаційної роботи М.В. Ільків пов'язаний з розробкою стратегії векторної доставки протипухлинної лікарської речовини з допомогою декількох наноносіїв на основі поліетиленгліколю (ПЕГ).

Усе вище викладене свідчить про непересічну актуальність обраного Мартою Володимирівною Ільків наукового напрямку дослідження в умовах *in vitro* та *in vivo* клітинних механізмів дії та терапевтичної ефективності протипухлинної сполуки похідного 2-амінотіазолу (з кодом БФ1) за ізольованого використання та в умовах формування комплексів з трьома різновидами ПЕГ-вмісних полімерних наноносіїв.

Отже, **мета** дисертаційного дослідження є надзвичайно актуальною. **Завдання** дослідження сформульовані коректно.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** 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».

**Структура роботи.** Дисертаційна робота М.В. Ільків містить такі розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів дослідження», «Висновки», «Список використаних джерел» та «Додатки». Дисертацію викладено на 174 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 45 рисунками та 6 таблицями. Список літератури сформовано з 181 найменування.

**Вступ** до дисертації написано послідовно і лаконічно. У ньому автор розкрила суть проблеми, обґрунтувала актуальність теми, окреслила мету і завдання дослідження, висвітлила наукову новизну і власний внесок, а також навела об'єкт, предмет і методи дослідження, вказала публікації та апробацію результатів дисертаційного дослідження.

У першому розділі «**Огляд літератури**» автором на надзвичайно високому рівні проаналізовано дані сучасної наукової літератури щодо трьох аспектів, які мають безпосереднє відношення до проблеми дисертаційного дослідження. По-перше, наведено ґрунтовний аналіз інформації щодо особливостей реакцій метаболізму та їх регуляції у пухлинних клітинах, зокрема процесів гліколізу, глутамінолізу і клітинного дихання. Чудово, що автор наводить цю інформацію

у порівняльному аспекті зі здоровими клітинами.

Також Марта Володимирівна дбайливо охарактеризувала стан системи антиоксидантного захисту та роль активних форм кисню в регуляції процесів життєдіяльності в нормальних і пухлинних клітинах.

Третя логічна частина огляду літератури дисертаційної роботи присвячена аналізу відомих молекул з протипухлинними властивостями – похідних тіазолу, а також сучасної стратегії підвищення біодоступності та протипухлинної активності з використанням нанорозмірних носіїв. Тут охарактеризовано зв'язок між хімічними і біологічними властивостями протипухлинних молекул-тіазолів. Також наведено найбільш важливу інформацію щодо різних типів наноносіїв лікарських засобів; проаналізовано переваги кожного з них та обґрунтовано переваги застосування саме полімерних наноносіїв для доставки протипухлинних препаратів.

Другий розділ дисертаційної роботи «**Матеріали та методи дослідження**» містить детальний опис методів дослідження, зокрема, культивування клітинних ліній та їх використання для визначення цитотоксичності сполук, експериментів *in vivo* на моделі лімфоми, препаративних процедур щодо печінки і крові, а також експериментів *in vitro* з цими біоматеріалами за допомогою біохімічного визначення вмісту супероксидного радикалу, вмісту первинних і вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів та активності ензимів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази) у клітинах печінки і лімфоми. Серед експериментальних методів автор також застосовує методи флуоресцентних досліджень для визначення вмісту активних форм кисню і потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани. Для дослідження швидкості дихання клітин автор застосовує полярографічний метод. Врешті, для розуміння змін у тканинах організму мишей за використання моделі лімфоми NK/Ly застосовано гістологічні дослідження печінки із використанням трансмісійної електронної мікроскопії та цитологічні показники крові тварин. Також у розділі два автор наводить потрібну для розуміння специфіки дослідів інформацію щодо структури і хімічних властивостей використаних у дослідженні молекул похідного тіазолу з кодом БФ1 та поліетиленгліколь-вмісних полімерних носіїв, а також позитивного контролю – відомого протипухлинного препарату доксорубіцину; вказано особливості приготування їх розчинів та використання у дослідженнях. Тож для вирішення поставлених завдань у роботі вдало застосовано низку найбільш сучасних і адекватних методів клітинної біології, біохімії, цитології та статистичного аналізу.

У третьому розділі «**Результати досліджень та їх обговорення**» автором наведено власні дані комплексного експериментального дослідження (методами

*in vitro* та *in vivo*) дії похідного тіазолу БФ1 та його конгломератів з ПЕГ-ПН. Зокрема, автором розкрито і кількісно проаналізовано цитотоксичні ефекти цих чинників (у порівнянні з відомим протипухлинним препаратом доксорубіцином) на пухлинні (гепатокарциноми людини HepG2; гліоми щура С6; гліобластоми людини ліній U251, T98G і U373; промієлоцитарного лейкозу HL-60) та не пухлинні (нирки ембріона людини HEK293 та фібробластів миші NIH3T3) клітини. Надзвичайно важливо, що сполука БФ1 і її комплекси з ПЕГ-ПН, на відміну від доксорубіцину, виявляли потужну (рівнозначну з доксорубіцином або вищу) цитотоксичність щодо пухлинних клітин, не впливаючи на нормальні клітинні лінії.

Також на клітинах лімфоми Немет-Келнера досліджено і проаналізовано процеси генерування активних форм кисню і перекисного окиснення, активність ензимів антиоксидантного захисту і функціонування мітохондрій за дії похідного тіазолу БФ1 та його конгломератів з ПЕГ-ПН. Важливо, що саме у комплексі з полімерними носіями сполука БФ1 має найбільшу ефективність окисного пошкодження та індукує апоптоз клітин лімфоми, що автор підтверджує також цитологічними дослідженнями.

Надзвичайно важливо, що автор також експериментами *in vivo* (використання моделі мишей з лімфомою) довела протипухлинну ефективність комплексу БФ1 з ПЕГ-ПН на тлі відсутності прооксидантної дії щодо тканини печінки тварин.

Також варто позитивно відзначити наявність транзитних висновків до кожного експериментального блоку та посилання на власні публікації автора, які містять результати досліджень.

Четвертий розділ дисертації «**Аналіз та узагальнення результатів дослідження**» містить обговорення і узагальнення експериментальних результатів. Варто відзначити надзвичайно вдале структурування матеріалу цього розділу, коли автор ставить ключові підсумкові питання щодо протипухлинної дії на тлі відсутності шкідливих впливів на нормальні клітини, а потім дає на них відповіді базуючись на аналізі результатів власних досліджень з урахуванням даних літератури.

Цей розділ завершується надзвичайно вдалою ілюстрацією підсумкової схеми механізмів цитотоксичної дії сполуки БФ1 в комплексі з ПЕГ-ПН, яка добре візуалізує встановлені автором клітинні ефекти похідного тіазолу.

**Висновки** дисертаційної роботи відповідають її змісту та поставленій меті, співставні з поставленими завданнями та висвітлюють головні наукові здобутки.

**Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Дисертація М.В. Ільків

«Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями» є закінченою кваліфікаційною роботою, в якій отримано нові наукові результати, що мають велику теоретичну і практичну цінність. Дослідження проведено з використанням достатньої кількості експериментального матеріалу і повторюваності дослідів. Аналіз одержаних результатів проведено із використанням комплексу максимально адекватних і сучасних методів та підходів. Залучення найбільш нових вітчизняних і закордонних наукових публікацій з досліджуваної тематики дало змогу автору всебічно проаналізувати та обговорити отримані результати досліджень. Подані у кінці кожного підрозділу висновки обґрунтовані результатами власних експериментальних досліджень, які належним чином проаналізовані статистично. Виклад основного матеріалу дисертації є коректним та відзначається високим науково-теоретичним рівнем.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Розглядаючи основні питання наукової новизни представленої дисертації, необхідно відзначити, що М.В. Ільків вперше провела комплексне дослідження механізмів цитотоксичної дії похідного тіазолу N-(5-бензил-1,3-тіазол-2-іл)-3,5-диметил-1-бензофуран-2-карбоксаміду в комплексі з трьома різновидами ПЕГ-вмісних полімерних наноносіїв.

У цьому дослідженні із використанням великої кількості клітинних ліній вперше встановлено протипухлинну цитотоксичну дію комплексу сполуки БФ1 з ПЕГ-ПН, яка базується на сплеску напрацювання активних форм кисню, що в свою чергу спричиняє формування первинних і вторинних продуктів перексидного окиснення ліпідів. Надзвичайно важливі нові результати дисертаційного дослідження (*in vitro* та *in vivo*) щодо вибіркової індукції зазначених цитотоксичних ефектів саме у пухлинних клітинах, на відміну від нормальних клітин.

**Практичне значення роботи.** Варто відзначити, що дисертаційне дослідження М.В. Ільків «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями» має велике практичне значення, оскільки в ньому розроблено і апробовано експериментами *in vivo* спосіб покращення розчинності та біодоступності БФ1, а також його спрямованої доставки до пухлинних клітин. Ці результати можуть бути покладені в основу методик формування комплексів лікарська речовина-наноносій для інших фармакологічних засобів.

Окрім того, наукові здобутки М.В. Ільків варто рекомендувати до подальших доклінічних досліджень для розробки протипухлинних препаратів. Також, результати дисертаційної роботи мають суттєве практичне значення з точки зору їх впровадження в педагогічний процес вищих навчальних закладів

біологічного та медичного спрямування. Цілком погоджуюся з викладеними автором у дисертаційній роботі науковою та практичною новизною.

**Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях.** Дисертація Ільків Марти Володомирівни «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями» виконана на достатньому експериментальному матеріалі за допомогою адекватних сучасних методик відповідно до мети та завдань дисертаційної роботи. Усі наукові положення і висновки цілком обґрунтовані, випливають зі змісту дисертаційної роботи, мають теоретичне і практичне значення.

Матеріали дисертаційної роботи повністю відображені в 15 друкованих працях, з яких 6 – статті у фахових наукових виданнях (причому усі вони індексуються у міжнародній наукометричній базі даних SCOPUS) та 1 – колективна монографія. Матеріали дисертації апробовані на 8 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.

**Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.** У дисертації М.В. Ільків «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями» не виявлено ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації та інших порушень, що могли б поставити під сумнів самостійний характер виконання дисертаційного дослідження.

**Дискусійні положення та зауваження щодо змісту та оформлення дисертації.**

Зауважень по суті до роботи не маю.

Для того, щоб заповнити цей розділ Відгуку зазначу наступне:

1. У підписах до рис. 3.1, 3.2 і 3.3 було б добре вказати розшифрування блоків А і Б. Також, для більшої наочності, було б добре представити дані цих рисунків у напівлогарифмічних координатах, оскільки вони візуалізують ефекти впливу на клітини досить широкого діапазону концентрацій (0.1-10 мкМ) речовин.

2. Як можна пояснити, що полімерний носій з кодом Th5 (на відміну від Th1 та Th3) підвищує рівень активних форм оксигену і при цьому не активує перекисного окиснення ліпідів?

3. Які, на Вашу думку, причини вибіркової дії похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН на пухлинні клітини?

4. Яким чином, на Вашу думку, може відбуватися усередині клітин звільнення БФ1 від фрагментів полімерних носіїв?

5. Оскільки іони кальцію є важливими регуляторами внутрішньоклітинних

процесів та активаторами апоптозу, було б добре продовжити дослідження дисертаційної роботи із вивченням накопичення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях та особливостей  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу в клітинах за дії похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-ПН.

Вказані зауваження та рекомендації не впливають на високу оцінку та наукову цінність дисертаційної роботи Марти Володимирівни Ільків.

**Загальний висновок про відповідність роботи встановленим вимогам.**

Аналіз дисертації та опублікованих праць дає підстави для висновку про те, що дослідження Ільків Марти Володимирівни є завершеним, цілісним та самостійним. Вважаю, що дисертаційна робота Ільків М.В. «Цитотоксична дія похідного тіазолу в комплексі з ПЕГ-вмісними полімерними наноносіями» за змістом, рівнем наукової новизни, практичним значенням та характером висновків відповідає галузі знань 09 Біологія, спеціальності 091 Біологія та 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 її автор – Ільків Марта Володимирівна – заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент,  
професор кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
Інституту високих технологій  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка МОН України,  
доктор біологічних наук, доцент

**Ольга ЦИМБАЛЮК**