ВІДГУК
офіційного опонента доктора біологічних наук, професора
Іскри Руслани Ярославівни
на дисертаційну роботу Скорохід Надії Романівни
«**Біологічна ефективність багатофункціональних наноматеріалів для адресної доставки традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів**», представлену на здобуття наукового ступеня
доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність обраної теми дисертації.

Рак залишається однією з головних причин смертності у світі. Всесвітня організація охорони здоров'я повідомляє про майже 10 млн смертей від онкологічних захворювань. Сучасні терапевтичні підходи до лікування раку базуються на використанні різних класів хіміотерапевтичних препаратів. За останнє десятиліття терапія раку еволюціонувала від застосування цитотоксичних препаратів широкого спектру дії до впровадження препаратів адресної дії. У біомедичних дослідженнях раку виявлено, що цілеспрямовану доставку протипухлинних препаратів безпосередньо до пухлинних клітин забезпечують наносистеми. Використання нанорозмірних носіїв забезпечує захист фармацевтичних препаратів, подолання біологічних бар'єрів, контрольоване вивільнення лікарських речовин в організмі та покращену циркуляцію препаратів у кровотоці. Незважаючи на переваги багатофункціональних наноматеріалів, головною перешкодою для їхнього впровадження залишається недостатня біосумісність і обмежена біодеградабельність. Тому актуальним завданням є пошук нових нанорозмірних носіїв для модуляції дії традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів, що дозволить покращити їхню терапевтичну ефективність і зменшити негативні побічні ефекти.

Мета і завдання дисертаційних досліджень сформульовані методично грамотно, вони побудовані з урахуванням результатів, які одержані іншими фахівцями, що дозволило автору визначити для дослідження пріоритетні напрями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота Надії Романівни виконана як частина фундаментальних досліджень відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України за темами: «Роль імуномодуляторної активності у протипухлинній дії традиційних та експериментальних медикаментозних препаратів за їх доставки полімерними наноносіями до різних клітин-мішеней in vitro та in vivo» (ДР №0122U002240, 2022-2024 рр.), «Посилення біологічної активності берберин-подібних алкалоїдів шляхом їх ковалентної і нековалентної модифікації» (ДР №0122U002241, 2022 р.), «Підвищення ефективності дії традиційних та експериментальних лікарських препаратів in vitro та in vivo шляхом їх іммобілізації на нанорозмірних носіях і 26 поєднання з антиоксидантами» (ДР №0117U000786, 2017-2021 рр). Наносистеми, що були використані у дослідженнях були розроблені в рамках співпраці з групою професора О.С. Заіченка (Національний університет «Львівська політехніка) та групою доктора Даніеля Горака (Інститут макромолекулярної хімії Чеської АН).

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дисертаційної роботи опубліковано у 2 статтях у фахових міжнародних журналах із сумарним імпакт-фактором 8,7 (Q1), 1 розділі монографії та 5 тезах доповідей на наукових конференціях

Структура, зміст і оформлення дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 225 сторінках тексту відповідно до поставленої мети і завдань. Загальна структура роботи побудована згідно вимог МОН України і містить усі необхідні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень та їх обговорення», «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел» та 9 додатків. Робота містить 64 рисунки і 10 таблиць, які добре підтверджують експериментальні дані, доповнюють текстовий матеріал дисертаційної роботи.

На початку роботи представлена ***анотація*** на українській (2-7) та англійській мовах (7-11), де стисло викладені основні результати досліджень,

новизна та практичне значення роботи також наводиться список публікацій дисертантки (12-16 ст).

У ***вступній частині*** (23-29 ст.) дисертації авторка дає 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 та апробацію результатів, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У розділі 1. «Огляд літератури» (30-56 ст.) представлено інформацію про сучасні підходи до хіміотерапії раку, такі як таргентна терапія та комбінована хіміотерапія. Описані механізми виникнення множинної медикаментозної резистентності пухлин та шляхи її подолання. Розкриті питання використання наноматеріалів у протипухлинній терапії, зокрема адресної доставка протипухлинних препаратів за допомогою наноматеріалів, пасивного та активного таргетування, подолання медикаментозної резистентності ракових клітин за допомогою наноносіїв. Описані основні види наноматеріалів, які використовують для доставки ліків у вигляді ліпосом, дендримерів, полімерних наноматеріалів. Розкрито структуру комплексів медикаментозних засобів із полімерними наноматеріалами. Описані полі (2-оксазоліни) (POx) як перспективна платформа для створення полімерних наноматеріалів. Також у літературному огляді описані багатофункціональні наноматеріали для доставки ліків в організмі, їх структура і переваги перед традиційними наноматеріалами. Розглянути особливості використання полімерних наноматеріалів та наночастинок у хіміотерапії раку. Приділено увагу проблемі біобезпеки та ефективності у застосуванні наноматеріалів в організмі.

У ***розділі 2*** «Матеріали та методи досліджень» (57-76 ст.) вказано, що у роботі дисертанткою були використані наноматеріали - полімерний носій на основі N-вінілпіролідон-5-(трет-бутилперокси)-5-метил-1-гексен-3-ін-гліцидил-метакрилату та його нанорозмірні комплекси з доксорубіцином; гребенеподібні амфіфільні полімерні носії із різними модифікаціями будови; нанокомпозити на основі гребенеподібних полімерних носіїв та алкалоїдів; мінеральні

наночастинки на основі оксиду заліза (III), функціоналізованих олеїновою кислотою і полі(етиленоксид)-блок-полі(ε-капролактоном).

У дослідження проведених *in vitro* використано панель злоякісних і псевдонормальних клітинних ліній людини та миші, які були отримані з колекції клітинних культур Інституту ракових досліджень Медичного університету Відня.

У дослідженнях *in vivo* використовували самців мишей ліній Balb/c, C57black/6, DBA/2 та BDF1 (гібрид Balb/c × DBA/2), розведених в Інституті біології клітини НАН України.

У дослідженнях були використані сучасні методи клітинної біології і цитології (культивування клітин, проточна цитофлуориметрія, світлова і флуоресцентна мікроскопія). Крім того, застосовували електрофорез в поліакриламідному гелі і Вестерн-блот аналіз клітинних білків, прищеплення пухлинних клітин тваринам in vivo, визначення показників гематологічного та біохімічного профілю (визначення активності ензимів і концентрації метаболітів) у піддослідних тварин і статистичне опрацювання результатів дослідження. Аналіз розділу 2 свідчить про високий методичний рівень проведених досліджень.

У ***розділі 3***. «Результати і обговорення» (77-153 ст.) висвітлені отримані результати власних досліджень, які вдало інтерпретуються автором. Дисертантка встановила, що збільшення цитотоксичної активності Dx-PC-NSE in vitro зумовлене двома різними механізмами: посиленим проникненням у клітини-мішені завдяки підвищеній ліпофільності системи доставки препарату, а також посиленим за допомогою PC-NSE вивільненням Dx у цитозолі пухлинних клітин. Дисертанткою виявлене дозозалежне посилення ко-іммобілізованим N-стеароїлетаноламіном терапевтичної активності Dx щодо двох типів мишачих пухлин: лімфоми NK/Ly та лейкозу L1210. Функціоналізація полімерної платформи за допомогою NSE для цільової доставки доксорубіцину дозволяє значно зменшити токсичний вплив останнього на організм лабораторних мишей. Було встановлено, що NSE сприяє нормалізації гематологічних і біохімічних показників, покращує виживаність мишей і

нормалізує їхню масу. При цьому показники морфо-функціонального стану тварин за дії вільного доксорубіцину і його кон'югованої форми з полімерним носієм були порушені. Було доведено ефективність іммобілізації берберину та 9-О-октил-берберину на трьох різних типах полімерних носіїв з гетероатомними бічними ланцюгами, що забезпечують їхню водорозчинність та біодеградабельність. Дослідження життєздатності клітин *in vitro* показали, що іммобілізація берберину та його синтетичного похідного на полімерних носіях призводить до посилення токсичної дії щодо пухлинних клітин, порівняно з вільними формами. Ступінь зниження життєздатності клітин під впливом нанокомплексів берберину (PC-PEG-Berb, PC-pEtOx-Berb, PC-PEGMA-Berb) залежить від типу полімерного носія. У той же час, нативні полімерні носії у вільній формі не викликають значного зниження життєздатності клітин у концентраціях, необхідних для доставки 50 мкМ берберину, що свідчить про їхню біосумісність. Дисертанткою встановлено, що використання нанокомплексів значно покращує розчинність алкалоїду берберину та 9-О-октил-берберину, підвищує їхню біодоступність і забезпечує кращий терапевтичний ефект щодо лікування меланоми B16/F10 у мишей, сприяючи повному одужанню 60% тварин і нормалізації життєво важливих показників. Усі три типи досліджуваних полімерів не мають вираженого цитотоксичного впливу на різні типи пухлинних і псевдонормальних клітинних ліній навіть у надвисоких концентраціях (>50 мг/мл) і не викликають негативних побічних ефектів у тварин. Найкращі показники біосумісності виявив полімерний носій VEP-co-GMA, функціоналізований полі-2-оксазоліном, який має потенціал для подальшого використання як платформа для доставки протипухлинних препаратів. Проведене дослідження твердих ліпідних магнітних частинок mag. SLPs показало їхній значний потенціал у протипухлинній терапії завдяки високій цитотоксичності та здатності долати множинну лікарську резистентність.

Розділ 4 «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» (154-157 ст.) містить аналіз одержаних результатів власних досліджень з обговоренням виявлених змін основних показників. Оцінюючи матеріали цього розділу необхідно відзначити наукову глибину проведеного дисертанткою аналізу отриманих даних. Дисертанткою була розроблена стратегія для підвищення ефективності дії вже відомих протипухлинних препаратів (доксорубіцину) та збільшення протипухлинного потенціалу експериментальних засобів (берберину та 9-О-октил-берберину) шляхом їх ко-іммобілізації на нанорозмірних носіях. А вивчення цитотоксичної активності магнітних наночастинок на основі оксиду феруму показало їх значний потенціал у лікуванні злоякісних захворювань і подоланні множинної медикаментозної резистентності. Подальші дослідження в цьому напрямку можуть відкрити можливість впровадження розроблених підходів у клінічну онкологію як альтернативної схеми цілеспрямованої доставки традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів.

Проведений аналіз результатів власних досліджень та їх узагальнення у цьому розділі дало можливість дисертантці зробити науково обґрунтовані висновки, які випливають з представленого в дисертації фактичного матеріалу.

Вісім висновків (158-159 ст.), що наведені у дисертації, достатньо висвітлюють одержані результати та основні положення дисертації. Висновки відповідають завданням дисертаційного дослідження та мають наукову цінність.

Список використаних джерел (160-183 ст.) налічує 202 джерела, 200 - на англійській мові, 1 - на російській і 1 - на українській. Більшість джерел опубліковані за останні роки.

Є 9 додатків (184-225 ст.) – це список публікацій автора за темою дисертації; характеристика клітинних ліній та відповідних середовищ; опис синтезу матеріалів полімерного носія; синтезу гребенеподібних полімерних носіїв; матеріали, що були використані у роботі; рисунки із результатами досліджень порівняння терапевтичної активності ПК та ПК-NSE у різних дозах, зміни гематологічного профілю та зміни маркерів гепато- та нефротоксичності у мишей лінії Balb/c; результати вивчення цитотоксичної дії берберину, його комплексів, іммобілізованих на носіях; результати вивчення цитотоксичної

активності полімерних носіїв in vitro щодо різних пухлинних та псевдонормальних ліній; зміни розподілу клітинного циклу в клітинах Т-лімфоцитів лінії Jurkat за дії mag.SLPs, SLPs, IO-OA та IO.

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

Основні наукові положення дисертації випливають з отриманих результатів експериментальних досліджень, вони ґрунтуються на глибокому їх аналізі. Дисертанткою були з'ясовані молекулярні механізми цитопротекторної активності канабіметика N-стеароїлетаноламіну за дії доксорубіцину та вивчено протипухлинний потенціал алкільних дериватів алкалоїда берберину. Також показано підвищення ефективності дії цих препаратів шляхом їхньої іммобілізації на нанорозмірних носіях полімерної природи, що допоможе у лікуванні злоякісних захворювань і подоланні множинної медикаментозної резистентності. На основі отриманих результатів експериментальних досліджень можуть бути розроблені теоретичні основи для клінічної онкології як альтернативної схеми цілеспрямованої доставки традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів. Запропоновані підходи дозволяють зменшити негативні побічні ефекти хіміотерапії (кардіотоксичність, гепатотоксичність), підвищити ефективність протипухлинних засобів та покращити результати лікування.

Основні положення дисертації науково обґрунтовані, достовірність яких підтверджена отриманими результатами та висновками, що приведені у дисертації.

Під час аналізу дисертаційної роботи Скорохід Н.Р. не виникли суттєві зауваження, зустрічаються редакційні помилки (посилання на таблиці з великої та з малої букви; вживання оксид феруму і оксид заліза і т.д.). Разом з тим, виникли деякі запитання, зокрема:

1. Як на вашу думку пояснити протекторну дію NSE? Чи володіє NSE антиоксидантними властивостями ? Який може бути механізм його дії?
2. Чому полімерні носії (PC) посилювали загально токсичну дію доксорубіцину (0,1 і 0,5 мг/кг) у тварин з лімфомою NK/Ly, зокрема

скорочували тривалість життя, хоча нативні полімерні носії не виявляли терапевтичної активності?

3. Який механізм протипухлинної дії берберину?
4. Чому найкращі результати щодо посилення цитотоксичної дії берберину та 9-О-октил-берберину виявила модифікація нанокомпозиту із прищепленим фрагментом полі-2-оксазоліну (PC-pEtOx)? Завдяки яким властивостям дія полі-2-оксазоліну (PC-pEtOx) відрізняється від дії гліцидилметакрилату (PC-PEGMA)?
5. Чому на вашу думку цитотоксичність магнітних наночастинок оксиду феруму (Mag.SLPs) щодо доксорубіцин-резистентних клітин лейкозу HL-60/adr знижувалася на 72 год, порівняно з 24 год?
6. Чому у Т-клітинах лінії Jurkat, оброблених магнітними наночастинками оксиду феруму (mag.SLPs) протягом 24 год, IC50 було вищим, порівняно з 72 год?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи Скорохід Надії Романівни «Біологічна ефективність багатофункціональних наноматеріалів для адресної доставки традиційних та експериментальних протипухлинних препаратів» є самостійним, завершеним науковим дослідженням. Актуальність обраної теми дослідження, новизна і практичне значення, достовірність одержаних результатів та повнота викладу в опублікованих працях свідчать про глибоку наукову самостійність авторки, сучасний рівень проведеного дослідження. У роботі відсутні порушення академічної доброчесності.

Отже, дисертаційна робота за актуальністю тематики досліджень та науково-методичним рівнем її виконання повністю відповідає вимогам Порядку присудження наукового ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою КМУ від 12 січня 2022 року №44 та постановою КМУ від 19 травня 2023 року № 502, а її

авторка, Скорохід Надія Романівна, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Офіційний опонент

Професор кафедри фізіології людини і тварин
Львівського національного університету імені Івана Франка,
доктор біологічних наук, професор Руслана ІСКРА