

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Манька Назара Олеговича на тему: «**Вплив біологічно активних речовин у комплексах з фрагментами хітозану і похідними полівінілпіролідону на життєздатність прокариотичних та еукаріотичних клітин**» подану до захисту у спеціалізовану вчену раду Інституту біології клітини Національної академії наук України на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091–біологія.

Актуальність обраної теми.

Дисертація присвячена дослідженню природних і синтетичні полімерів та їх похідних з метою розширення можливості застосування медичних препаратів, зменшення їхньої загальної токсичності, пролонгування їхньої дії в організмі людини, чи прискорення детоксикації організму. Однак, полімери використовують не лише як каркас для приєднання різноманітних ліків, але й як такі, що мають власну біологічну активність. Полімери, які призначені для біомедичних цілей повинні мати високу біосумісність із біологічними тканинами та здатність до біодеструкції. Цим вимогам найкраще відповідають матеріали на основі природних полімерів, такі як хітозан, що є основним похідним хітину, його вважають одним із найбільш перспективних полімерів природного походження. Він є біосумісним, нетоксичним і біодеградабельним полімером, однак недоліком є складність отримання, використання та хімічної модифікації.

Полівінілпіролідон є синтетичним полімером, що дає можливість швидко його отримувати в промислових масштабах, легкі та доступні процеси стандартизації, а також широка можливість щодо хімічних модифікацій. Але його інертність щодо організму, імуногенність спричиняють значні перешкоди щодо його застосування.

Незважаючи на численні наукові роботи, присвячені вивченню різних аспектів застосування полімерів як транспортерів лікарських засобів, дисертаційна робота Манька Н.О. щодо з'ясування фізико-хімічних і

біологічних властивостей фрагментів хітозану і його комплексів із різними біологічно активними речовинами, а також комплексу модифікованого полівінлпіролідону зі специфічними пептидами на мікроорганізми, нормальні та пухлинні лінії клітин ссавців є актуальною і має елементи новизни.

Дисертаційна робота Манька Н.О. виконана на базі Інституту біології клітини НАН України в рамках теми відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу «Підвищення ефективності дії лікарських препаратів *in vitro* та *in vivo* шляхом їх іммобілізації нанорозмірними носіями та поєднання з антиоксидантами» (ДР №0117U000786, 2017-2021 рр.) і позабюджетної теми відділу в рамках гранту фірми Фольксваген (Німеччина) «Щодо розуміння сигнальних мереж, залучених у загибель клітин за дії лактаптину» (2016-2019 рр.).

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

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

Основні наукові положення дисертації впливають з отриманих результатів експериментальних досліджень, вони ґрунтуються на глибокому аналізі та узагальненні одержаних результатів. Ряд наукових положень дисертаційної роботи сформульовані вперше, що свідчить про новизну, вказує на вагоме теоретичне і практичне значення одержаних результатів. Зокрема, дисертантом розроблено оригінальну методику отримання хітозану з тіла бджіл, вивчені умови його стерилізації та зберігання. Здійснене системне вивчення властивостей похідних хітозану з бджіл у порівнянні з властивостями хітозану з крабів. Встановлено підвищення розчинності хітозану зі зменшенням його молекулярної маси, тоді як його біологічна

активність щодо грибів роду *C. albicans* знижується, і навпаки, протигрибкова активність є вищою у фракцій хітозану з більшою молекулярною масою. Дисертантом також розроблено оригінальну методику отримання хітозану із плодових тіл грибів.

Продемонстровано ефективність застосування хітозану як носія медикаментозних препаратів для покращення фармакокінетики шляхом пролонгації перебування цих препаратів у кровоносному руслі.

За допомогою іммобілізації мономерної форми трипептиду Сер-Про-Цис на похідних полівінлпіролідону створено пептидоміметик, що володіє протипухлинною активністю *in vitro* щодо клітин лінії MCF7, HCT116, HEPG2 та *in vivo* щодо лімфоми NK/Ly у мишей лінії C57/Black. Ця комплексна сполука має відносно малу токсичність щодо псевдонормальних ліній клітин ембріональної нирки людини HEK293, та клітин мишачих макрофагів J774.2. Найбільш активний комплекс PN5 модифікованого полівінлпіролідону з трипептидом після ідентифікації структури за допомогою ЯМР був названий P4P.

Підтверджено наявність комплексу модифікованого полівінлпіролідону з трипептидом із приєднаної молекулою FITC (P4P-FITC) в везикулах (лізосомах) клітин лінії MCF7. Доведена роль АФК у цитотоксичній активності комплексу P4P. Дисертантом розроблено оригінальний прийом отримання білків мішеней за допомогою магнітних частинок. Визначені внутрішньоклітинні білки мішені комплексу P4P – структурні білки клітини (актин, кератин, цитоплазматичний бета актин) та сироватковий альбумін.

Важливим науковим доробком дисертаційної роботи є встановлення біологічних особливостей полімерів природного і синтетичного походження та подальше кон'югування їх з медичними препаратами, що може забезпечити подолання резистентності як бактерій так і пухлин.

Дисертаційна робота викладена на 158 сторінках машинного тексту, вона містить 43 рисунків та 7 таблиць. Загальна структура роботи, в основному, побудована згідно вимог МОН України і містить усі необхідні розділи: огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати дослідження, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаної літератури і 1 додаток.

У **вступній частині** 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 теоретичне і практичне значення, висвітлює особистий внесок здобувача та апробацію результатів, їх публікацію, обсяг і структуру дисертації.

У **розділі 1** Огляд літератури «Застосування природних і синтетичних полімерів у біології і медицині» дисертант розкрив літературний огляд досліджуваного питання, який представлений на 24 стор. (26-49 ст.) з аналізом зарубіжних публікацій. У цьому розділі достатньо повно розкрито суть поставленої мети і завдань виконаних досліджень, глибоко проаналізовані і раціонально використані літературні джерела. У певній послідовності проаналізована література, що характеризує особливості хітозану, загальну характеристику і біомедичні аспекти його застосування при лікуванні ран та опіків, наголошено на протимікробних властивостях хітозану, його використання як платформи для доставки ліків. У розділі також представлені біологічні та фізико-хімічні властивості полівінілпіролідону, його використання як платформи для доставки ліків. Автором проведений глибокий аналіз літературних даних щодо використання пептидоміметиків у біології і медицині, їх походження та джерела отримання. Представлено шляхи модифікації пептидів та їх застосування як безпечних

кандидатів для розробки ліків. Вкінці розділу подається короткий підсумок огляду літератури.

Наукова оцінка проведеного аналізу літературного огляду дає підстави вважати, що Манько Н.О. добре володіє сучасною науковою літературою та здобув достатній обсяг знань з напрямку досліджень за темою дисертаційної роботи.

Проведений аналіз **розділу 2** «Матеріали і методи дослідження», що представлений на 12 сторінках (50-61 ст.), показав, що експериментальна частина дисертаційної роботи виконана з використанням методів культивування еукаріотичних клітин, оцінювання життєздатності клітин, роботи з мікробіологічними об'єктами та лабораторними тваринами. Дисертантом проведено визначення середньої молекулярної маси продуктів гідролізу хітозану методом віскозиметрії, спектроскопічне дослідження методом FTIR спектроскопії, спектрофотометричне дослідження методом UV-vis спектроскопії, аналіз розподілу молекул хітозану за молекулярною масою методом електрофорезу, культивування культури клітин та визначення цитотоксичності за допомогою тесту з використанням МТТ, визначення протибактерійної активності методом МТТ, вивчення протигрибкової активності за допомогою визначення колонієутворюючих одиниць, методи детекції FITC мічених носіїв, детекції АФК за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням DCFDA, отримання нормальних лімфоцити людини та їх культивування *in vitro*, приготування хітозан-етакридинового комплексу, вивчення фармакокінетики комплексу хітозан-етакридин, фарбування клітин нейтральним червоним та Hoechst 33342, виявлення білків-мішеней комплексу Р4Р за допомогою мас-спектрометрії.

Відносно методів досліджень принципових зауважень не відзначено.

Розділ 3. «Результати досліджень» викладений на 58 сторінках (ст. 62-119). У ньому представлені оригінальні методики отримання природного

полімеру хітозану з різних джерел: з панциру крабів, підмору бджіл *Apis mellifera* і базидіального гриба *Lactarius pergamenus*. Дисертантом проведено спектрометричний аналіз FTIR очищених хітозанів і визначено їхню молекулярну масу. Із підмору бджіл одержано хітозан-меланіновий комплекс з біологічною активністю, відмінною від активності очищеного хітозану. Виявлено низьку токсичність хітозану та хітозан-меланінового комплексу за дози 0,2 мг/мл щодо псевдонормальних клітин нирка ембріона людини лінії HEK293 і активованих мітогеном нормальних лімфоцитів крові людини. Встановлено, що хітозан-меланіновий комплекс володіє вираженою фунгіцидною дією контактного типу, яка зменшується зі зниженням молекулярної маси цього комплексу і залежить від вмісту в ньому меланіну. Виявлено, що хітозан-меланіновий комплекс є токсичним щодо грибів *Candida albicans* як штаму C88 дикого типу, так і штаму N12 із мультирезистентністю. Дисертантом встановлено, що іммобілізація на хітозані краба антисептика етакридину лактату пролонгує дію цього антисептика в організмі мишей.

Дисертантом протестовано за типом дії пептидоміметиків кон'югат синтетичного полімеру полівінілпіролідону з мономерною формою трипептиду Сер-Про-Цис. Встановлено, що така іммобілізація суттєво підвищує токсичність цього трипептида щодо пухлинних клітин. Комплекси трипептиду Сер-Про-Цис із вказаним носієм гальмують ріст лімфоми NK/Ly у мишей лінії C57/Black. Було встановлено, що трипептид Сер-Про-Цис, ковалентно кон'югований із полівінілпіролідоновим похідним, міченим FITC, проникає через 2-6 год в клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини і накопичується у везикулах (лізосомах), але не потрапляє у ядро клітин. Підтверджено роль H_2O_2 в механізмі цитотоксичної дії комплексу Р4Р щодо пухлинних клітин лінії MCF7. За допомогою MALDI-TOFF мас-спектрометрії дисертантом ідентифіковані внутрішньоклітинні білки, які

взаємодіють з комплексом Р4Р в клітинах мишачої лімфоми NK/Ly і можуть слугувати його молекулярними мішенями. Серед ідентифікованих білків встановлені такі структурні білки клітин як актин, кератин цитоскелету, цитоплазматичний бета актин, міозин, а також сироватковий альбумін.

Розділ 4 «Аналіз та обговорення результатів дослідження», який представлений на 8 сторінках (ст. 120-127), містить системний аналіз одержаних результатів власних досліджень. У ньому дисертант підтверджує перспективність застосування полімерів природнього та синтетичного походження у біології та медицині. Використання природніх полімерів забезпечує високу біосумісність, низьку токсичність та біологічну активність самих полімерів і їх похідних. Натомість недоліками даних полімерів є складнощі в отриманні, використанні, стандартизації та хімічної модифікації. Використання полімерів синтетичного походження забезпечує можливість швидкого отримання їх в промислових масштабах, легкі та доступні процеси стандартизації, а також широку можливість щодо хімічних модифікацій. Але токсичність, інертність щодо організму, імуногенність спричиняють значні перешкоди щодо їх застосування. Тому використання полімерів різного походження повинно бути продиктовано конкретними медичними, біотехнологічними та технологічними завданнями.

Оцінюючи матеріали цього розділу необхідно відзначити наукову глибину проведеного дисертантом аналізу отриманих даних. На основі вивчення матеріалів цього розділу можна стверджувати, що викладені в дисертаційній роботі результати достатньо науково опрацьовані, у співставленні з даними зарубіжної літератури, на належному методичному рівні. Проведений аналіз результатів досліджень та їх узагальнення у цьому розділі дало можливість дисертанту зробити науково-обґрунтовані висновки, які впливають з представленого в дисертації фактичного матеріалу.

Сім висновків, що приведені у дисертації (ст. 128-129) достатньо повно висвітлюють одержані результати та основні положення дисертації.

Список використаної літератури містить 239 іноземних публікацій. Більша частина (близько 55%) джерел у списку літератури опубліковані за останні 10 років.

Дисертація оформлена на належному науковому рівні, написана державною мовою. Таблиці і рисунки виконані якісно та добре ілюструють і підтверджують експериментальні дані, доповнюють текстовий матеріал дисертаційної роботи.

Повнота викладу результатів досліджень в опублікованих працях.

Детальний аналіз дисертаційних матеріалів, проведений у період їх рецензування, свідчить, що результати наукової роботи Манько Н.О. є підсумком завершених досліджень, які впродовж періоду їх виконання всебічно аналізувалися і висвітлені у 12 наукових працях, у тому числі 4 статтях, з яких 3 – опубліковані в міжнародних періодичних виданнях з кваліфікаційними Q1–Q2 і 1 – в Українському біохімічному журналі з кваліфікацією Q4, та 8 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях в Україні і за кордоном. Основні положення дисертації науково аргументовані та в повній мірі відображені в наукових статтях.

У дисертаційній роботі та публікаціях автора відсутній плагіат та порушення академічної доброчесності.

Висловлюючи позитивну оцінку дисертаційної роботи в цілому, необхідно зробити окремі зауваження і вказати на деякі технічні упущення, що були виявлені в період її аналізу:

- У вступі (ст. 21-22) методи досліджень мають знаходитися після мети і завдань досліджень.
- Узагальнюючі підсумки, які є після кожного пункту результатів досліджень дисертації, не виділені після пунктів 3.2.1 і 3.2.2.

- У першому абзаці перед висновками (ст.128) доцільно було наголосити, як саме вирішена наукова проблема і для чого в кінцевому розумінні призначене запропоноване автором розв'язання.

Зустрічаються технічні та граматичні помилки у тексті.

У процесі аналізу дисертаційної роботи виникли деякі запитання до здобувача:

- Чому для досліджень протибактерійної дії ви вибрали вивчення впливу кон'югатів з пептидами, а не з антибіотиками? Що вам відомо про такі дослідження з літератури?
- На ст.109-110 вказано, що кон'югати PN2, PN5, PN6, та їхні носії діють на пухлинні клітини лише певної етіології, тобто їхнє застосування є відносно спеціалізованим. За рахунок чого це може відбуватися?
- Як ви вважаєте, чи кон'югати трипептиду Сер-Про-Цис із полівінілпіролідом впливають на індуктори апоптозу у пухлинних клітинах ?

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

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Підсумовуючи проведений аналіз та оцінку дисертаційної роботи Манька Н.О. на тему: «Вплив біологічно активних речовин у комплексах з фрагментами хітозану і похідними полівінілпіролідону на життєздатність прокаріотичних та еукаріотичних клітин» необхідно відзначити, що дисертація є самостійною завершеною науковою працею, в якій викладені нові експериментальні дані, які свідчать, що модифікація полімерів природнього (хітозану) та синтетичного (полівінілпіролідону) походження і подальше їх кон'югування з медичними препаратами може забезпечити

подолання резистентності як бактерій так і пухлин, також принципово змінити біологічну активність молекул різного генезу.

Дисертаційна робота за актуальністю тематики досліджень, обсягом і науково-методичним рівнем їх виконання, новизною і практичним значенням, науковою обґрунтованістю одержаних результатів та викладених положень відповідає п. 9, 10, 11, 12 «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженому постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 р. № 167, а її автор Манько Назар Олегович заслуговує здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091–біологія.

Офіційний опонент

Доктор біологічних наук, ст. н. співробітник,
завідувач лабораторії біохімії
адаптації та онтогенезу тварин
Інституту біології тварин НААН

Р.Я. Іскра

Підпис д.б.н. Р.Я. Іскри засвідчую:
головний фахівець ВК
Інституту біології тварин НААН,
канд. с.-г. наук

І.В. Невоструєва



19.04.2021 р.