

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Шамелашвілі Карини Леонідівни «Регуляція
оксидативного стресу крові щурів-пухлиноносіїв за введення
протираковинної системи Реній-Платина», подану на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія
(Біологічні науки)

Актуальність теми дисертаційної роботи. Традиційно вважається, що активація вільно-радикальних процесів є невід'ємною складовою канцерогенезу на різних етапах, призводячи до ініціації сигнальних каскадів, промоції, безпосереднього ураження макромолекул. Тому активні форми кисню (АФК) залишаються у методологічному наборі широкого кола дослідників деструктивними молекулами малоспецифічної дії, підвищений рівень яких є ознакою патологічного процесу (у тому числі і онкогенезу). Відповідно, антиоксиданти – знешкоджувачі радикалів – виявляють властивості антиканцерогенів. Лише у останні декади були отримані конкретні докази двоякої ролі пероксиду гідрогену (так званого молекулярного Джекїла та Гайда (Jekyll and Hyde)), що проявляє різко відмінну поведінку залежно від ситуації, виконуючи сигнальну функцію. Тому, з огляду на потребу у переосмисленні ролі АФК у світлі останніх результатів щодо молекулярних механізмів їх дії та практичні перспективи дослідження для вибору стратегічних підходів у попередженні та лікуванні злоякісної трансформації клітин, актуальною проблемою біологічних наук пошук ефективних антиоксидантів та міметиків природних ензимів, зокрема каталази.

Металоорганічні комплекси становлять групу найбільш ймовірних міметиків природних антиоксидантів. Створення їх новітніх форм, які поєднують декілька чинників (зокрема нанобінів, Т. O'Halloran et al., 2013) та забезпечують «розумну доставку» препарату (як приклад, S. Prylutska...R. Stoika, 2017), вимагає всебічної верифікації їх ефективності. Дисертація представляє новий етап досліджень у науковій школі проф Н.І. Штеменко, що вивчає антипухлинні властивості препаратів на основі органічних сполук ренію (III). Про актуальність і оригінальність цього напрямку свідчить, що у пошуковій системі Scopus термін «isobutyratodirhenium» за категорією «все» міститься у 27 роботах, здебільшого останніх років і виконані у галузі «Biochemistry, Genetics and Molecular Biology», а у 10 з них автором є проф Н.І. Штеменко. Більше того, останній огляд (Bauer et al. 2019. Organometallic and coordination rhenium compounds and their potential in cancer therapy. Coordination Chemistry Reviews 393. P: 79-117) аргументовано доводить перспективність використання цих сполук у протираковій терапії. Серед нанобінів найкраще вивченими є нанобіни доксорубіцину, тоді як поєднання сполук ренію з цисплатином є новим методичним прийомом, який очікувано забезпечує вищу ефективність сполук платини (Collery et al., 2012).

Для дисертаційного дослідження було обрано у якості індикаторів чинники антиоксидантного захисту у крові. Такий методичний підхід цілком виправдано у зв'язку з можливістю використання цих показників у клінічній практиці. Відтак, тема дисертації присвячена актуальній науковій проблемі сучасної біохімії та окреслює адекватний напрямок досліджень у її вирішенні.

Зв'язок теми з державними і галузевими програмами. Дисертантка була виконавцем науково-дослідних тем «Наноліпосоми та тверді наночастки, навантажені системою Реній-Платина у моделях гепато-, нефропатій та гемолітичних анемії» кафедри біофізики та біохімії Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара (№ 0113U003034); «Біологічні основи морфогенезу органів та тканин під впливом нанометалів в експерименті» кафедри медичної біології, фармакогнозії та ботаніки ДЗ «Дніпропетровської медичної академії МОЗ України» (№ 0115U004879), у рамках яких виконано представлене дослідження, що свідчить про державну значимість теми дисертації.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у дослідженні широкого спектру органічних похідних диРенію (III) та різних форм і поєднань його введення за верифікованим набором біохімічних та морфологічних показників пухлинного росту. Це дало можливість довести та порівняти антиоксидантний потенціал цих препаратів. Виявлено відмінності у чутливості ензимів антиоксидантного захисту еритроцитів у тварин із звичайною та резистентною до цисплатину карциномами Герена. У експерименті *in vitro* з використанням комерційного препарату каталази встановлено синергізм у дії каталази та сполук диРенію та залежність діапазону впливу від природи цис-органічних лігандів кластерного фрагменту. Аналіз джерел літератури свідчить про наявність лише фрагментарних досліджень такого спрямування у реферованих виданнях. Відтак, новизна результатів, представлених у рецензованій дисертації, не викликає сумніву.

Практичне значення і перспектива роботи полягає у створенні підґрунтя для застосування кластерних сполуки диРенію(III) у якості корегуючих засобів та біоміметиків з активностями каталази за лікування пухлинних захворювань. Запропоновано біомаркери ефективності антипухлинної терапії із застосуванням ензимів крові. Апробацію результатів дослідження здійснено науковими колективами медичних навчальних закладів України (Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського та Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького).

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації. Дисертація виконана на репрезентативній виборці експериментальних груп з дотриманням етичних норм, з використанням традиційних методів біохімії, які загалом адекватні меті та задачам роботи та достатньо інформативні. Результати досліджень

статистично опрацьовані. Наукові положення обґрунтовані, висновки відповідають поставленим задачам та змісту роботи і повністю відображають результати.

Матеріали дисертаційної роботи у повному обсязі відображені у 25 публікаціях, з яких 2- наукові статті у виданнях, які входять до міжнародної наукової бази Scopus, 4 – статті у фахових вітчизняних періодичних виданнях, 7 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Здобувачеві належить суттєвий внесок у плануванні експерименту, його виконанні, опрацюванні наукової літератури та отриманих результатів, а також попередніх дослідженнях у рамках даного напрямку роботи колективу під керівництвом проф. Н.І. Штеменко.

Структура роботи

Дисертаційну роботу Шамелашвілі К.Л. побудовано згідно вимог до оформлення та викладено на 152 стор загального тексту (103 стор. Основої частини). Результати роботи проілюстровано 16 рисунками та 23 таблицями. У структурі роботи виокремлено Вступ (С: 22-28), розділи, присвячені огляду літератури (С: 29-49), матеріалам і методам дослідження (С: 50-63), викладу власних результатів дослідження (С: 64-109), їх узагальненню (С: 64-109). Робота завершується сімома висновками та списком використаної літератури (191 найменування, з яких 146 латиницею) та додатками (Акти впровадження). Співвідношення та обсяг окремих частин роботи відповідають вимогам до оформлення дисертації, затвердженим МОН України.

Аналіз змісту дисертаційної роботи. У Вступі авторка, аргументуючи актуальність власного дослідження, наголошує на антиоксидантному потенціалі широкого спектру синтезованих сполук Ренію, та необхідності залучення антиоксидантів у терапію пухлинних захворювань, зокрема резистентних до традиційної хіміотерапії пухлинних форм. Відповідно формулюються мета роботи та конкретні завдання, зміст яких відповідає різноманіттю експериментальних сценаріїв оцінки антиоксидантних ефектів спектру синтезованих сполук Ренію на моделях периферійної крові щурів та комерційного препарату каталази. Формулювання Об'єкту, предмету та методів дослідження не викликає зауважень. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

Огляд літератури (РОЗДІЛ 1. Регуляція оксидативного стресу еритроцитів щурів-пухлиноносіїв за введення протипухлинної системи реній-платина) некоректно іменованій як «літературний огляд», що є типовим і багаторазово критикованим огріхом оформлення дисертацій, який припускає, що огляди бувають і нелітературні. У ньому розглядаються послідовно Загальні принципи регуляції оксидативного стресу в еритроциті (1.1), де влучно використовується класифікація стресу та обґрунтовується доцільність вивчення показників окисного стресу у еритроцитах за пухлинного росту. У підрозділі 1.2. «Кластерні сполуки Ренію з алкільними лігандами як антиоксиданти», як справедливо зазначає автор «синтез більшості сполук

Ренію....., та дослідження біохімічних властивостей сполук Ренію з почварним зв'язком є пріоритетом України». Більше того, сам термін «почверний зв'язок» (англ. «quadruple bond») є екзотичним видом зв'язку між атомами металу, а сполуки, що його містять, практично не досліджено за біологічними ефектами. Дисертантка дає детальний аналіз здобутків наукової школи. Проте деякі тези Огляду потребують уточнення та посилань. Так, у Розділі 2 «Матеріали...» з'являється термін «біологічно активні ліганди» (нові сполуки ряду *цис*- і *транс*-дикарбоксилатівдиренію(III) із заміщеними адамантильними, індольними і ферулатними лігандами), який потребує деталізації у Огляді. У підрозділі 1.3. «Навантажені ліпосоми та наночастки як ефективні антиканцерогенні препарати» подається аналіз переваг наночастинок, що містять інкапсульовану у ліпідний матрикс речовину, у порівнянні з іншими формами. Тут варто було згадати пілотні роботи по створенню нанобінів та смарт-системам доставки препаратів, зокрема роботи Р.С. Стойки та Т. О'Наллоран з колегами. У підрозділі 1.4. «Будова каталази та її роль як антиоксиданта» йдеться про будову, фізико-хімічні властивості, функцію цього ензиму, а також принципів створення міметиків цього ензиму та супероксиддисмутази. Загалом, в Огляді авторці вдалося уникнути типових недоліків (зайвої хрестоматійності та деталізації) та проаналізувати сучасні джерела літератури. Розділ завершується узагальненням, яке перераховує основні положення.

У розділі «Матеріали і методи дослідження» детально подано опис досліджених за біологічними властивостями сполук Ренію та їх форм, а також способів їх введення. Таблична форма/схема полегшила б сприйняття цього багатоманіття. Охарактеризовано техніку створення моделі пухлинного росту та морфометричний аналіз пухлини. Загальновідомі методи визначення активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази у гемолізаті крові, Ферум (II)-індукованої генерації утворення ТБК-активних продуктів у плазмі крові та їх вмісту у еритроцитах занадто деталізовано за зразком методики для лабораторного практикуму.

Розділ III, присвячений *Результатам досліджень*, об'єднує фактичний матеріал за тематичними блоками. У **підрозділі 3.1. «Регуляція оксидативного стресу ...»** оцінюється вплив способу введення кластерних сполук Ренію і системи Реній-Платина на інтенсивність оксидативного стресу та активність ферментів антиоксидантного захисту за розвитку карциноми Герена (3.1.1). Показано, що антиоксидантний ефект сполук Ренію, визначений за вмістом ТБК-АП у плазмі крові за введення способом 2 поєднувався з антипухлинним, на відміну від результатів за схемою 1. Причому дисертантка відзначає, що діапазон дії суттєво більший, ніж за терапії традиційними гасниками АФК (вітаміни А, С, Е). Цікаво, що вплив системи Реній-Платина, або ж її складників проявлявся дисбалансом активностей супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази та каталази. У під підрозділі 3.1.2 доводиться, що вплив кластерних сполук Ренію з адамантильними лігандами і системи Реній-Платина викликає більш

виражений антиоксидантний ефект, зокрема, щодо каталазної активності, ніж сполук з алкільними лігандами. Особливо ефективним виявився спосіб 2. У підпідрозділі 3.1.3 розглянуто вплив сполук, які позиціонуються як сполуки Ренію з біологічно активними лігандами, на стан показників окисного стресу у крові. Як доведено дисертанткою, ефект цих сполук також проявляється як антиоксидантний та гальмівний щодо новоутворення. Причому інтенсивність позитивного впливу цих сполук найвища, особливо з ферулатними лігандами за ознаками активації каталазної та глутатіонпероксидазної активностей. Відтак, порівняльний аналіз сполук Ренію з різними лігандами дозволив виявити найбільш ефективні з них.

У підрозділі 3.2 «*Активність ферментів антиоксидантного захисту за розвитку резистентної до цисплатину карциноми Герена та введення цитостатиків*» виокремлюються результати для груп тварин, яким прививали карциному Герена, резистентну для цисплатина. Порівняння з показниками, повідомлених щодо груп з карциною, чутливою до цисплатини, виявляють цікаві відмінності. Зокрема у резистентній групі значно вища активність ензимів антиоксидантного захисту. Така особливість викликає логічне запитання, чи доцільно посилювати антиоксидантний захист у таких тварин? Вплив сполук Ренія по різному проявляється у групах з різними видами карциноми і лише активність глутатіонпероксидази за введення сполук Ренію з ферулатними лігандами за обох видів карциноми зростала.

У продовження попередніх праць наукового колективу, дисертант дослідила сполуки ренію у якості мім етика каталазної активності (**підрозділ 3.3**). Слід зазначити, що, як відомо, пероксид Гідрогену легко піддається декомпозиції під впливом майже всіх типів каталізаторів. Тому тонкі механізми корекції цього процесу у клітинах надзвичайно важливі. Дисертанткою виявлено, що власна каталітична активність кластерних сполук Ренію щодо пероксиду досить висока (40% у порівнянні з нативною каталазою). Більше того, за поєднаної дії каталази та сполук Ренію спостерігається значний синергічний ефект. Авторка припускається версії, що відбувається взаємодія за гістидиновими залишками. з огляду на залучення гістидину у зв'язок з гемом та втрату каталазної активності за низьких значень рН, тобто протонізації радикалу гістидину, що характерно для гемових протеїнів. Для аргументації використовується аналіз спектру каталази у типових УФ-ділянці та ділянці піку Соре.

Розділ **Заключення** присвячено порівняльному аналізу та узагальненню результатів про ефективність сполук Ренію у забезпеченні антиоксидантного захисту за пухлинного росту за різних схем та пропонуються біохімічні механізми їх антиоксидантної активності залежно від форми введення, характеру пухлини та на моделі каталази *in vitro*. Результати добре систематизовано та коректно обговорено.

Дисертантка формулює сім *висновків*, які відображають сутність отриманих результатів і відповідають поставленим задачам.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка питань щодо інтерпретації результатів та зауважень до оформлення.

Перш за все, звертають на себе увагу недоліки у форматуванні, недбалості та граматичні огріхи:

Чому маленькі за обсягом таблиці подано з розривом на сторінці, як у дисертації (Табл. 2.1, 2.4, 3.1, 3.3, 3.4, 3.7, 3.13, 3.15, 3.17), так і у авторефераті (табл 2, 4)?

Недбалості у оформленні джерел літератури, наприклад Корольок М. Л. Иванова И. Г. и др; LushchakVolodymyr I.

Приклади граматичної недбалості: мета: «визначення ...властивостей ... сполук... та їхню ...активність»; С 43 Рис 1.2 у підписі немає коми, але є «дисплатинном», С 30 модифікрваних, С 39 важаємо, С 45 загибленого гему, тощо.

Зауваження до опису методів дослідження та цифрового оформлення результатів:

А) Не можна підміняти характеристики ензимів еритроцитів і крові (гемолізату). Так активність ензимів визначалась не в еритроцитах, як анонсовано (напр. табл 2.4, с. 55), а у гемолізаті, що суттєво впливає на інтерпретацію результатів, адже ензимна активність та ізоформний склад ензимів плазми можуть бути зумовлені руйнуванням клітинних бар'єрів печінки, тощо. Одиниці вимірів незрозумілі (для каталази Кат/л – л чого?). Активність еритроцитарних ензимів виражають у розрахунку на концентрацію гемоглобіну або кількість/об'єм еритроцитів.

Б) чому ТБК-АП продукти визначали у плазмі за умов індукції іонами Fe (II), а в еритроцитах – існуючі продукти, причому з відмінностями – кип'ятіння годину (!?), або без нього (с 55). Про яку верхню фазу йдеться, коли не було гетерогенних фаз, тобто хлороформної екстракції?

В). С 60 0,73 мл буфера на 200 мкг протеїну цитозольної фракції. – що це?

Г) У табл. 2.2 , 2.3, у контролі немає об'єму плазми, але ж має бути відповідний об'єм буферу, що не вказано.

Зауваження щодо некоректності посилань на авторство: С 44 термін «нанобіни» супроводжувався посиланням лише у Вступі. Варто було і у огляді вказати (с 44), тим більше, що посилання № 116 не відповідає оригінальним роботам, зокрема групи Т. V. O'Halloran (*Theranostics* 2013; 3(7):496-506). (We have developed a novel liposomal nanoparticle drug encapsulation and formulation platform, that we named the nanobin); Очевидно ТБК-АП визначали у плазмі крові не за методикою Андреевої, а, як описано Андреевою – це не автор методу; Рис 1.1 не подано посилання на джерело ілюстрації. Для аргументації твердження у Вступі «Відомо, що еритроцит є клітиною, редокс-стан якої віддзеркалює редокс-стан усього організму» обрано невіддале посилання (Bartoszek M., 2006) це посилання на маргінальну роботу, опубліковану у

матеріалах III International Symposium on Medical Physics). Більш того, робота не стосується еритроцитів.

Разом з тим, зауваження, які виникли до рецензованої роботи, стосуються, здебільшого, технічних питань оформлення тексту, а встановлені недоліки у поданні наукових результатів не применшують наукової цінності отриманих результатів.

Висновок про відповідність

В цілому дисертація К.Л. Шамелашвілі є завершеною роботою, яку відзначає великий об'єм проведених досліджень щодо вирішення конкретного питання біохімії – обрання оптимальних умов корекції пухлинного росту органічними кластерними сполуками диРенію (III) за ознаками окисного стресу у периферійній крові щурів та впливом на активність каталази у системі *in vitro*. Дисертантка продемонструвала високий рівень працездатності, експериментальної кваліфікації, аналітичні здібності. Одержані результати відкривають нові можливості у розумінні процесів корекції пухлинного росту та їх оцінки за біохімічними критеріями.

На основі вищезазначеного вважаю, що кандидатська дисертація Шамелашвілі Карини Леонідівни «Регуляція окисативного стресу крові щурів-пухлиноносіїв за введення протипухлинної системи Реній-Платина» за актуальністю проблеми, методичними підходами, зробленими висновками, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів є завершеною науковою працею і відповідає вимогам п.п. 9,11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ N 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016 р.), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – Біохімія.

Професор кафедри хімії
та методики її навчання

Тернопільського національного педагогічного університету
імені Володимира Гнатюка
доктор біологічних наук



О.Б. Столяр

20.08.2019

