

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о.

Директор Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України,
академік НАН та АМН України,
доктор біологічних наук, професор
Сергій КОМІСАРЕНКО
протокол №4 від 09. 07. 2024 р.



Воскис

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне
значення результатів дисертації

Дарії ЖУКОВОЇ

«Біологічні властивості куркуміну, адсорбованого на протеїнах»,
поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії
в галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія

1. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Куркумін – це природний антиоксидант з нейропротекторною, антипроліферативною, проапоптотичною, протипухлинною, протизапальною активностями. Низька розчинність куркуміну у воді та його швидкий катаболізм знижує його біодоступність. Низка перспективних способів підвищення біодоступності куркуміну включає хімічні модифікації, везикулярні платформи доставки на основі наночастинок, екзосоми або міцели, а також утворення комплексів з протеїнами та іншими біомолекулами. Серед перерахованих способів носії на основі протеїнів для адресної доставки куркуміну до пухлинних клітин становлять практичний інтерес через можливість використання природних поліпептидних лігандів для рецепторів, які слугують маркерами пухлинних клітин. Дифтерійний токсин (ДТ) є одним із найбільш вивчених природних цитотоксичних агентів зі специфічністю до асоційованого з пухлинними клітинами рецептора proHB-EGF (гепарин-зв'язувальний EGF-подібний фактор росту), який на сьогодні є перспективним онкомаркером і розглядається як потенційна мішень для доставки хіміопрепаратів. Специфічне інгібування розчинної форми HB-EGF за допомогою дифтерійного токсиду CRM197 широко вивчається як перспективний спосіб лікування ряду пухлинних захворювань людини, але все ще має низьку ефективність через недостатню цитотоксичну активність щодо малігнізованих клітин *in vivo*. З огляду на сказане, обрана тема дисертаційного дослідження здобувача є актуальною.

2. Мета та завдання дисертації. Метою роботи було одержання комплексів куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 для підвищення біодоступності та специфічної доставки куркуміну в клітини та характеристика отриманих комплексів.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- 1) Отримати комплекси куркуміну з протеїнами BSA та CRM197 та охарактеризувати їх фізико-хімічні властивості;
- 2) Дослідити цитотоксичний вплив отриманих комплексів щодо малігнізованих клітин;
- 3) Оцінити дію куркуміну, протеїнових носіїв та протеїн-куркумінових комплексів щодо немалігнізованих клітин;
- 4) Вивчити механізми взаємодії куркуміну та його протеїнових комплексів з поверхнею малігнізованих клітин;
- 5) Визначити механізми цитотоксичного впливу отриманих комплексів на малігнізовані клітини;
- 6) Дослідити імуногенність протеїнових носіїв куркуміну.

3. Наукова новизна одержаних результатів. В роботі вперше отримано та охарактеризовано комплекси куркуміну з дифтерійним токсодом CRM197 та його В-фрагментом та продемонстровано вищий рівень пригнічення клітинних ліній A431 та MDA-MB-231 отриманими комплексами у порівнянні з комплексом куркуміну з BSA, вільним куркуміном та вільним CRM197 або його В-фрагментом.

4. Теоретичне значення одержаних результатів. Теоретичні положення, сформульовані за результатами проведених досліджень та опрацювання інших теоретичних і практичних даних, розширюють існуючі уявлення про біологічні властивості як окремо рекомбінантних носіїв на основі похідних дифтерійного токсину, так і їх комплексів з куркуміном. токсичність карбонових.

5. Практичне значення одержаних результатів. Створення нанокомплексів куркуміну з протеїновими носіями дозволяє поєднати застосування антиоксиданту природного походження з широким спектром біологічної активності з адресною доставкою його до пухлинних клітин за рахунок високої афінності протеїнового носія до рецепторів, що мають підвищену експресію на поверхні пухлинних клітин. У роботі досліджувалося два принципово різних типи протеїнових носіїв – BSA та CRM197 (та його субодиниця SbB). BSA використовувався як метод неспецифічної доставки куркуміну в клітини. Нетоксичне похідне дифтерійного токсину CRM197 та його В-фрагмент за рахунок своєї специфічності до рецептору proHB-EGF використовувалися як засоби специфічної доставки куркуміну в клітини з надекспресією цього рецептору. У роботі було доведено стабільність комплексів у водних середовищах та ефективність впливу на малігнізовані

клітини. Отже, запропоновані похідні ДТ можуть бути використані для подальших досліджень можливості їх використання у медичній практиці як засобів специфічної доставки лікарських засобів до пухлинних клітин. З іншого боку, комплекси куркуміну з похідними ДТ, що володіють широким спектром протипухлинної активності, мають перспективи знайти застосування як фармацевтичні препарати для комплексної терапії онкологічних захворювань.

6. Особистий внесок здобувача. Автором самостійно були підібрано та проаналізовано джерел літератури а стосовно теми дисертаційної роботи, здійснено їх аналіз. Автором отримано наноконплеси куркуміну з протеїнами, досліджено їх спектрофотометричні та біологічні властивості зокрема вплив наноконплесів на малігнізовані клітини (здатність до кригнічення виживання індукування процесів апоптозу та некрозу), нароблено й очищено рекомбінантні антигени, проведено імунізацію лабораторних тварин з метою оцінки імуногенності рекомбінантних протеїнових носіїв. Окрім того автором проведено статистичну обробку отриманих результатів. Автор щиро вдячний усім співробітникам лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Зокрема, науковому керівнику д.б.н., проф Д.В. Колибо, н.с., к.б.н. Криніній О.І. та н.с., к.б.н. Сіромолоту А.А. за консультації у роботі при використанні метало-афінної хроматографії та протокової цитофлуориметрії, н.с., к.б.н. Манойлову К.Ю. за консультації у роботі з прокаріотичними та евкаріотичними клітинами

7. Публікації результатів роботи, їх обговорення. Основні результати дисертації знайшли відображення у 2-ох друкованих працях, які опубліковані у періодичних наукових виданнях, віднесених до першого-третього квартилів (Q1-Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Report та 1-єї праці фахового національного видання. Аналіз внеску автора у публікації з питань, висвітлених у дисертації, показав, що внесок Жукової Дарії Андріївни є вирішальним, зокрема у працях:

1. **Dariia Zhukova**, Daryna Katashynska, Andrii Siromolot, Svitlana Romaniuk, Denys Kolybo, Serhiy Komisarenko. Nontoxic diphtheria toxin derivatives CRM197 and B-fragment can serve as the means for targeted curcumin delivery into sensitive cancer cells. Journal of Drug Delivery Science and Technology. Volume 96, 2024, 105673, ISSN 1773-2247, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105673>

(Особистий внесок здобувача – проведення всіх етапів експериментів, аналіз отриманих даних, написання тексту статті) **Scopus**;

2. **Zhukova D.A.**, Hrabovskyi O.O. Complexation of curcumin with bovine serum albumin and diphtheria toxoid CRM197. Biotechnologia Acta T. 16, No. 6 , 2023, p. 62-67. doi.org/10.15407/biotech16.06.076 (Особистий внесок здобувача – проведення спектрофотометричних досліджень, написання тексту статті). Наукове фахове видання України (категорія Б);

3. Shatursky OY, Manoilov KY, Gorbatiuk OB, Usenko MO, Zhukova DA, Vovk AI, Kobzar OL, Triakash IO, Borisova TA, Kolibo DV, Komisarenko SV. The geometry of diphtheria toxoid CRM197 channel assessed by thiazolium salts and nonelectrolytes. *Biophys J.* 2021 Jun 15;120(12):2577-2591. doi: 10.1016/j.bpj.2021.04.028. Epub 2021 May 1. PMID: 33940022; PMCID: PMC8390859. *(Особистий внесок здобувача – проведення дослідження цитотоксичності на клітинних лініях, написання частини тексту статті)*
Scopus i PubMed

8. **Апробація результатів дисертації.** Основні результати наукових досліджень проводилися в межах національних та міжнародних конференцій: «XII Український біохімічний конгрес», вересень 30 - жовтень 4, 2019 (Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського), «Молодь та поступ до біології», Біологічний факультет Львівського національного університету 9 –11 квітня, 2019. Київ Україна.

9. **Інформація щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень.** Дослідження були проведені на культурах малігнізованих клітин людини лінії A431 (епідермоїдна карцинома), MDA-MB-231 (аденокарцинома молочної залози), Jurkat (Т-клітинна лімфома) та немалігнізована клітинна лінія 4BL (активовані В-лімфоцити). NHA/TS і гліобластоми лінії U87MG. Малігнізовані клітини A431, MDA-MB-231, Jurkat були отримані з колекції клітин Інститут біохімії ім.О.В. Палладіна НАН України. Культура клітин 4BL були надані професором Любов Лукаш з Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Робота проводилася з дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки відповідно до вказівок та рекомендацій Гельсінської декларації (1975) з доповненнями від 2000 та 2008 років для роботи з використанням людського матеріалу. Це підтверджено експертним рішенням Комісії з біологічної безпеки та біоетики Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (протокол №6, від 4 липня 2024 року).

Таким чином, за результатами публічної презентації Дарією ЖУКОВОЮ наукових результатів дисертації «Біологічні властивості куркуміну, адсорбованого на протеїнах» та її обговорення на розширеному засіданні професорсько-викладацького складу Випускної кафедри ЗВО Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та наукового семінару «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України ухвалили:

1. Вважати, що дисертація Дарії ЖУКОВОЇ на тему «Біологічні властивості куркуміну, адсорбованого на протеїнах» є завершеною науковою працею та відповідає спеціальності 091 «Біологія та Біохімія»

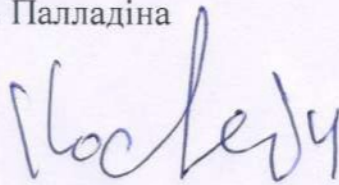
2. Вважати, що дисертація Дарії ЖУКОВОЇ відповідає «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №261 від 23 березня 2016 року, та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (пп. 6, 7, 8), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р.

3. Рекомендувати дисертацію Дарії ЖУКОВОЇ на тему «Біологічні властивості куркуміну, адсорбованого на протеїнах» до захисту на засіданні разової спеціалізованої вченої ради за спеціальністю 091 «Біологія та Біохімія».

18.07.2024 р.

Головуючий, заступник директора
з наукової роботи

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
академік НАН України,
д.б.н., професор



Сергій КОСТЕРІН

Завідувач Випускної кафедри
ЗВО Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
д.б.н., с.н.с.



Лідія БАБІЧ

Секретар засідання, науковий співробітник
відділу молекулярної імунології
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
к.б.н.



Андрій СІРОМОЛОТ