

РЕЦЕНЗІЯ
на дисертаційну роботу
Дарії ЖУКОВОЇ
«БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КУРКУМІНУ, АДСОРБОВАНОГО НА
ПРОТЕЇНАХ»,
яка подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії
у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія

Куркумін – поліфенольна сполука природного походження, основним джерелом якої є кореневища рослини *Curcuma longa*. На сьогодні, куркумін розглядають як фітохімічний агент з нейропротекторними, антипроліферативними, проапоптотичними, протипухлинними та протизапальними властивостями, що визначає його широке застосування у народній медицині та медичній практиці. Через велику неполярну частину молекули куркумін важко розчинний у воді, що є однією з причин його низької біодоступності для організму ссавців, в тому числі і людини. Крім того, куркумін швидко катаболізується, що обмежує його широке терапевтичне застосування у природному стані. Існує кілька перспективних способів підвищення біодоступності куркуміну, в тому числі хімічні модифікації, везикулярні системи доставки на основі наночастинок, екзосом або міцел, а також комплексів з протеїнами та іншими біомолекулами. Серед розроблених підходів, протеїнові носії для цільової доставки куркуміну до пухлинних клітин становлять практичний інтерес завдяки потенційній можливості використання їх афінності до низки рецепторів, які мають підвищений рівень експресії на поверхні цих клітин. Зокрема, дифтерійний токсин (ДТ) є одним із найбільш детально вивчених природних цитотоксичних агентів, що специфічно зв'язується з мембранним протеїном proHB-EGF, рівень експресії якого зростає залежно від типу пухлинних клітин. proHB-EGF розглядається як потенційна мішень для доставки хіміопрепаратів до пухлинних клітин шляхом ліганд-індукованого ендоцитозу. Протеїн CRM197, генетично модифікована форма ДТ, містить

одиначну мутацію в положенні 52, яка призводить до заміщення залишку Glu на Gly і втрати ADP-рибозилтрансферазної активності. Водночас, мутований протеїн не втрачає здатності специфічно зв'язуватися з proHB-EGF.

Завдяки втраті токсичності CRM197 широко використовується в медичній практиці як протеїновий носій для виробництва кон'югованих вакцин та цільової доставки хіміопрепаратів. Утворення комплексів куркуміну з протеїновими носіями, зокрема CRM197, може бути ефективним підходом для підвищення його біодоступності, і, як наслідок, терапевтичного потенціалу. Сказаним визначається актуальність теми та практична значимість результатів дисертаційної роботи Дарії ЖУКОВОЇ, повністю присвяченої отриманню комплексів CRM197 та його похідних з куркуміном, дослідженню їх властивостей, системному аналізу протипухлинних ефектів отриманих комплексів на моделях ліній клітин з різним рівнем експресії proHB-EGF.

У першому розділі дисертаційної роботи детально описано й проаналізовано особливості будови куркуміну, способи його отримання та фізико-хімічні властивості. Особливу увагу приділено аналізу сучасного стану проблеми стосовно механізмів реалізації регуляторних ефектів куркуміну на живі організми та способам підвищення його біодоступності. Необхідно зазначити, що матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертантки, а також про її здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу. На жаль, в розділі «Огляд літератури» мають місце описки, друкарські помилки, важкі стилістичні звороти, невдалі вирази та переклади термінів з англійської мови.

Для виконання поставлених завдань дисертантка використала низку сучасних методів біохімії, молекулярної та клітинної біології, мікробіології, імунології та комп'ютерного моделювання: одержання комплексів куркуміну з протеїнами, гель-електрофорез в ПААГ для розділення протеїнів, метало-афінну хроматографію для очищення рекомбінантних протеїнів, систему експресії рекомбінантних протеїнів у бактерійній системі, твердофазний

імуноензимний аналіз, спектрофотометрію, протокову цитофлуориметрію, конфокальну мікроскопію, культивування еукаріотичних клітин, а також методи аналізу молекулярного докінгу *in silico* та статистичної обробки результатів досліджень з їх подальшим аналізом.

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

Дисертаційна робота відповідає пріоритетним напрямкам розвитку науки в галузі біохімії людини та тварин і була виконана згідно з планом науково-дослідних робіт відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках базової науково-дослідної роботи фундаментальних досліджень НАН України за темою «Визначення рецепторів, залучених у регуляцію імунобіологічних функцій організму» (№ д/р 0119U002511, 2019 - 2023 рр.).

Особистий внесок здобувача та новизна отриманих результатів.

ЖУКОВА Дарія самостійно підбрала та проаналізувала джерела літератури за темою дисертації. Результати, отримані дисертанткою, мають достатній рівень новизни. Вперше були отримані комплекси куркуміну з нетоксичним похідним дифтерійного токсину CRM197 та його В-фрагментом, охарактеризовані їх фізико-хімічні та біологічні властивості. Підвищення рівня життєздатності клітин під дією блокатора каналу пори CRM197 дозволило припустити, що цитотоксичний вплив CRM197 частково може опосередковуватись його пороутворювальною активністю. Було продемонстровано, що отримані комплекси куркуміну з CRM197 ефективніше пригнічують життєздатність пухлинних клітин ліній A431 та MDA-MB-231, індукують процеси апоптозу і некрозу порівняно з дією комплексу куркуміну з BSA, вільним куркуміном та вільним CRM197 або його В-фрагментом. Важливо зауважити, що використання запропонованих комплексів щодо немалігнізованих умовно нормальних клітин показало відсутність цитотоксичного впливу. Досліджено також вплив куркумін-протеїнових комплексів на зміну рівнів вмісту/активності основних сигнальних протеїнів, залучених до підтримання ступеня малігнізації

досліджуваних пухлинних клітин. Виявлено залежність імуногенності нетоксичних похідних дифтерійного токсину від їх розміру, що дозволило запропонувати меншу субодиницю SbV як носій куркуміну при створенні комерційних препаратів. Здійснено статистичну обробку отриманих даних. Планування роботи та аналіз результатів досліджень виконувалися у співпраці з науковим керівником.

Результати проведених досліджень дозволили Дарії ЖУКОВОЇ зробити обґрунтований висновок щодо перспективності використання похідних CRM197 не тільки як засобів для цільової доставки лікарських препаратів до пухлинних клітин, але і для посилення ефективності протипухлинної терапії у програмах комплексного лікування онкологічних захворювань.

Рисунки та таблиці, представлені у дисертації, є переважно чіткими та інформативними. Висновки, наведені наприкінці рукопису дисертації, є лаконічними й відображають отримані результати.

Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях

Результати дисертаційного дослідження Дарії ЖУКОВОЇ повністю висвітлено у 3 наукових статтях, опублікованих у фахових міжнародних та вітчизняних виданнях, що входять до наукометричних баз Scopus та Web of Science відповідно до вимог Постанови №44 Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р. «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а також апробовані на 2 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Структура дисертації. За формальними ознаками дисертаційна робота Дарії ЖУКОВОЇ відповідає встановленим вимогам: вона складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, трьох основних розділів, «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати та їх обговорення», а також узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаної літератури, що включає 270 посилань на

першоджерела. Робота викладена на 161 сторінці комп'ютерного набору та містить 32 рисунки і 3 таблиці.

Зауваження та запитання.

1. На схемі будови нетоксичних похідних дифтерійного токсину (Рис. 3.1) необхідно вказати місце локалізації одиночного заміщення.

2. Які методичні підходи були описані в літературі для отримання комплексів CRM197 з терапевтично значимими лігандами? Наскільки їх можна порівняти з тими, що були використані в дисертаційній роботі?

3. Препарати рекомбінантних протеїнів, очищених метало-афінною хроматографією, містять домішки, ймовірно бактерійного походження. Чи були спроби отримати препарати SbB і CRM197 вищого ступеня очищення?

4. Чи досліджувався внесок 6-His послідовності на ефективність зв'язування куркуміну?

5. Електрофорез в ПААГ за присутності SDS дає інформацію про відносну молекулярну масу досліджуваних протеїнів, тому не можна робити висновки про відповідність між M_r і амінокислотою послідовністю SbB і CRM197.

6. Аналіз спектрів поглинання комплексів BSA і CRM197 з куркуміном залежно від концентрації останнього дозволяє виявити ще один пік при 260 нм, про який не йде мова в дисертації. Чи є припущення про можливу природу цього піку? Максимальне поглинання при 425 нм є характерним для BSA, і це значення знижується для комплексів з куркуміном. Як можна пояснити цей феномен?

7. Чи може існувати кореляція між результатами спектрального аналізу і результатами, отриманими за допомогою молекулярного докінгу?

8. Чи вивчалась стабільність отриманих куркуміно-протеїнових комплексів, що є важливим показником для їх використання з терапевтичною метою?

9. За даними МТТ-тесту робиться висновок про низьку цитотоксичність CRM197 і його похідних, що дозволяє використовувати ці

протеїни для доставки ліків в клітини-мішені. Водночас, на підставі дослідження пороутворювальних властивостей CRM197 робиться висновок про необхідність застосування блокатора каналу пори, зумовленої CRM197, для зниження його цитотоксичності і, відповідно, підвищення життєздатності клітин-мішеней.

10. За даними конфокальної мікроскопії, як куркумін, так і його комплекси ефективно зв'язуються з поверхнею клітин, проте характеризуються різною динамікою проникнення в клітини. Цей процес є швидшим для куркуміну і значно повільнішим для його комплексів. Дисертантка пояснює цю різницю зв'язуванням комплексів з HB-EGF, що не підтверджено експериментальними даними. Чи можна припустити, що куркумін завдяки своїй гідрофобності заякорюється в мембрану з наступним індукуванням ендоцитозу?

11. Необхідно також зазначити, що дисертаційне дослідження спрямоване на аналіз впливу отриманих комплексів з використанням лише двох ліній пухлинних клітин (аденокарциномні клітини грудної залози людини лінії MDA-MB-231 і епідермоїдної карциноми людини лінії A431), що може обмежувати узагальнення результатів для інших типів ракових клітин.

12. Для багатьох типів клітин в культурі експресія EGFR коливається в межах $(0,4-1,0) \times 10^5$ рецепторів на клітину, тоді як клітини A431 експресують до 2×10^6 молекул EGFR на клітину. Чи є в літературі подібні дані для HB-EGF?

13. Чи дозволяють отримані експериментальні дані зробити остаточний висновок про механізми транслокації куркуміно-протеїнових комплексів всередину клітин-мішеней?

14. Які потенційні механізми можуть опосередковувати активацію рецептора EGFR за участі комплексу SbB-куркумін?

15. Не всі результати проведених досліджень знайшли відображення в остаточних висновках.

Загальний висновок.

Дисертаційна робота Дарії ЖУКОВОЇ «БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КУРКУМІНУ, АДСОРБОВАНОГО НА ПРОТЕЇНАХ» є завершеним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною та обґрунтованістю наукових результатів, що мають теоретичне та практичне значення і повноцінно відображені в наукових публікаціях, відповідає вимогам Постанови КМУ «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12.01.2022 р. № 44 і може бути представлена до офіційного захисту на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.

Рецензент

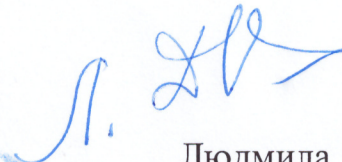
Завідувач відділу

сигнальних механізмів клітини

Інституту біохімії

ім. О.В. Палладіна НАН України

доктор біологічних наук, професор



Людмила ДРОБОТ

