

Рішення
разової спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії

Здобувачка ступеня доктора філософії Дарія ЖУКОВА, 1988 року народження, громадянка України, освіта вища: закінчила у 2011 році Київський національний університет імені Тараса Шевченка за спеціальністю «Мікробіологія та вірусологія», працює молодшим науковим співробітником в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, виконала акредитовану освітньо-наукову програму «Біологія та біохімія».

Разова спеціалізована вчена рада, утворена наказом Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, від «24» липня 2024 року № 22-а, у складі:

Голови разової спеціалізованої вченої ради	Володимира ЧЕРНИШЕНКА , д.б.н., ст.досл., зав. відділу структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
Рецензентів	Людмили ДРОБОТ , д.б.н., проф., зав. відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України Миколи КАНЮКА , к.б.н., с.н.с. відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
Офіційних опонентів	Ростислава СТОЙКИ , д.б.н., член-кор НАН України, зав. відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України Наталі БЕЗДЕНЄЖНИХ , д.б.н., ст.дослідник, п.н.с. відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

на засіданні 12 вересня 2024 року прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія Дарії ЖУКОВІЙ на підставі публічного захисту дисертації «Біологічні властивості куркуміну, адсорбованого на протеїнах» за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.

Дисертацію виконано в Інституті Біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Києва.

Науковий керівник Денис КОЛИБО, д.б.н., професор, Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, головний науковий співробітник відділу молекулярної імунології

Дисертацію подано у вигляді спеціально підготовленого рукопису українською мовою, що відповідає вимогам пункту 6 Порядку присудження ступеня

доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44 (зі змінами).

Дисертація Дарії Жукової є самостійною та ґрунтовною науковою працею, що виконана з дотриманням вимог академічної доброчесності, отримані результати якої мають важливе теоретичне та практичне значення для галузі знань Біологія. Дисертаційна робота Дарії Жукової присвячена дослідженню біологічних властивостей протеїнових комплексів з куркуміном, що включало дослідження їх цитотоксичних властивостей щодо малігнізованих клітин. Наукова новизна полягає у тому, що 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.

Здобувачка має 3 наукових публікацій за темою дисертації у наукових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань, 2 з яких у періодичному науковому виданні проіндексованому у базі Scopus та віднесені до першого квартеля (Q1) відповідно до SCImago Journal and Country Rank та 2 доповідей та тез на наукових конференціях:

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>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224724003423>
2. Zhukova D.A., Hrabovskyi O.O. Complexation of curcumin with bovine serum albumin and diphtheria toxoid CRM197. *Biothechnologia Acta T.* 16, No. 6, 2023, p. 62-67. doi.org/10.15407/biotech16.06.076. https://biotechnology.kiev.ua/images/BTA/2023/6_2023/Atamanchuk6_2023.pdf
3. Shatursky OY, Manoilo 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.

У дискусії взяли участь голова, рецензенти, офіційні опоненти та висловили зауваження:

1. **Володимир ЧЕРНИШЕНКО**, д.б.н., ст. досл., зав.відділу структури і функцій білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, без зауважень.
2. **Людмила ДРОБОТ**, д.б.н., проф., зав.відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна надала позитивну рецензію

із зауваженнями:

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 висновок про відповідність між M_r і амінокислотною 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.
- 3. Микола КАНЮК**, к.б.н., с.н.с. відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна надав позитивну рецензію із зауваженнями:
1. Куркумін успішно застосовують для лікування шкіри та слизових оболонок у вигляді компоненту в спиртових розчинах та мазах. Але використання куркуміну для профілактики або лікуванню нейродегенеративних та ракових захворювань обмежено через його низьку біодоступність. Саме із цією метою розробляють підходи до збільшення біодоступності куркуміну.
 2. В тексті роботи присутні деякі незначні друкарські помилки.
 3. Зустрічається заміна скорочень на латиніцу, як в тексті так і в малюнках дисертаційної роботи, що потребує правки.
 4. Перелік використаної літератури потребує упорядкуванню відповідно вимогам.
- 4. Ростислав СТОЙКА**, д.б.н., член-кор НАН України, зав.відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України надав позитивний відгук із зауваженнями
1. В змісті «Огляду літератури» авторкою виділено спеціальний підрозділ «Спосіб отримання куркуміну», що не стосується теми дисертаційної роботи.
 2. Біоетичну експертизу роботи з лабораторними тваринами проведено відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Разом з тим, авторка не вказала в своїй роботі номер протоколу

комісії з біоетики і дату її засідання.

3. За результатами молекулярного докінгу авторці необхідно вказати кількісні характеристики (ступінь афінності) взаємодії куркуміну з протеїном CRM197 дифтерійного токсину та з його субодиницею SbB.

4. На Рис. 3.4 (стор. 76) необхідно вказати стрілками домінантні білки на електрофореграмі, оскільки ці білки далекі від гомогенності. До речі, на стор. 113 в розділі «Обговорення» авторка стверджує, що на підставі наведеної електрофореграми можна зробити висновок про достатньо високий рівень чистоти (очевидно, гомогенності) отриманих протеїнів, що не відповідає дійсності.

5. В кінці підрозділів «Результатів дослідження» прийнято вказувати, де опубліковані наведені результати.

6. На Рис. 3.8 (стор. 81) для кращої наочності необхідно було навести криві залежності доза-ефект при визначенні IC50 не лише для вільного куркуміну, але й для його комплексів з протеїном CRM197 дифтерійного токсину та з його субодиницею SbB.

7. Представлення залежності доза-ефект доцільно надавати в однаковій системі координат (див. Рис. 3.8, 3.15, 3.16, 3.17), щоб читачу було зручно сприймати наведені результати.

8. Практично в усій дисертаційній роботі в рисунках по осі ординат вказано оптичне поглинання, флуоресценція і т.п., тоді як фактично це умовні одиниці, що вказують на цитотоксину дію, індукцію апоптозу і т.п. Це необхідно було чітко пояснити в підписах до відповідних рисунків.

9. На стор. 109 наведено Рис. 3.24 (схема сигнального шляху), який відноситься до «Обговорення результатів», а не до «Результатів власних досліджень».

10. На стор. 105 авторка роботи вживає невдалий вислів «протилежні шляхи загибелі клітин шляхом апоптозу і некрозу». Зважаючи на існування феномену «некроптоз» ці шляхи не можна вважати протилежними.

11. В тексті роботи авторка використовує термін «нанок комплекси», не маючи доказів про «нанорозміри» досліджуваних частинок.

12. Чи дійсно авторка роботи вважає доцільним використовувати високотехнологічний і дорогий продукт, яким є протеїн CRM197 дифтерійного токсину та його субодиниця SbB для іммобілізації відносно дешевого продукту, яким є куркумін

5. Наталя БЕЗДЕНЄЖНИХ, д.б.н., ст.дослідник, п.н.с. відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України надала позитивний відгук із зауваженнями:

1. Автором по тексту дисертації часто застосовується термін «нанок комплекс» відносно комплексу куркуміну із тестованими в роботі носіями, але які є докази щодо коректності відношення компонентів тестованих зразків до «нано»?

2. В анотації та результатах власних досліджень в більшості випадків наведено концентрацію досліджуваних агентів в мкг/мл або в мг/мл, тоді як в аналізі та узагальненні результатів роботи наведено концентрації

- тестованих агентів в мкМ, що ускладнює оцінку отриманих результатів.
3. Оскільки в роботі наведено концентрації досліджуваних компонентів в різних одиницях виміру і по тексту зустрічаються певні неточності – рекомендовано при представленні роботи на захисті надати узагальнюючу таблицю із IC50 всіх тестованих агентів в однакових одиницях виміру.
 4. Автором застосовано формулювання (в списку скорочень): «IC50 – напівлетальна доза», що не є коректним, оскільки напівлетальна доза має скорочення LD50 та застосовується зазвичай для оцінки летальності під дією речовини (при оцінці гострої токсичності) на експериментальних тваринах, тоді як IC50 – індекс цитотоксичності, або концентрація напівмаксимального інгібування, що зазвичай застосовується в експериментальних системах з використанням культур клітин.
 5. Автором в дисертаційній роботі в розділі «Результати досліджень» наведено рисунки, в яких часто по осі ординат надано «оптичне поглинання», що є не зовсім коректним способом формулювання при оформленні рисунків та не є зручним для порівняльного аналізу, що потребує додаткових коректив.
 6. В розділі 3.2.4. автором наведено дані відносно порівняльної чутливості злоякісно трансформованих клітин з іморталізованими, і надано клітинні лінії з різними адгезивними характеристиками (відносно субстратзалежності), але виникає питання чому наведено дані відносно однієї концентрації досліджуваних агентів / комплексів? Автором надаються висновки відносно різниці чутливості пухлинних та нормальних клітин, але таке судження потребує більшої деталізації і більш широкого діапазону дослідних концентрацій агентів для формування подібних заключень.
 7. В кінці кожного підрозділу «Результати дослідження» рекомендовано надати інформацію, де були опубліковані наведені результати.

Результати відкритого голосування:

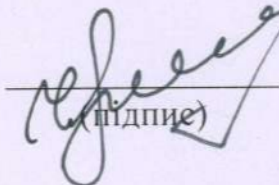
«За» 5 членів ради,

«Проти» немає членів ради.

На підставі відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада присуджує Дарії ЖУКОВІЙ ступінь доктора філософії у галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 – Біологія та Біохімія.

Відеозапис трансляції захисту дисертації додається.

Голова разової
спеціалізованої
вченої ради


(підпис)

