

ВІДГУК
ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА
на дисертаційну роботу
ШУЛЬГИ СЕРГІЯ МИХАЙЛОВИЧА
«СТВОРЕННЯ ТРАНСПОРТНИХ НАНОСИСТЕМ НА ОСНОВІ
ЕСЕНЦІАЛЬНИХ ФОСФОЛІПІДІВ ОЛІЇ СОНЯШНИКА ДЛЯ
ПОСИЛЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ КУРКУМІНУ»,
представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність дисертаційного дослідження. Наразі не існує ефективних засобів для лікування нейродегенеративних захворювань, зокрема хвороб Альцгеймера, Паркінсона, Гентінгтона. Існуючі лікарські препарати незначно сповільнюють їх перебіг, але не запобігають руйнуванню синаптичних зв'язків та порушенню нейрональних мереж, які відповідають за когнітивні процеси та механізми пам'яті, що веде до слабоумства та смерті пацієнтів. Значний інтерес у дослідників викликають рослинні метаболіти, зокрема флавоноїди, які володіють потужними антиоксидантними, протизапальними та фармакологічними ефектами. Тому актуальним є пошук нових біотехнологічних підходів у терапії амілоїдозу та когнітивних порушень за хвороби Альцгеймера.

Дисертаційна робота присвячена створенню ліпосомальної форми куркуміну та вивченню механізмів його взаємодії з амілоїдними пептидами у випадку моделювання хвороби Альцгеймера *in silico* та *in vivo*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася в рамках наукових програм Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», а також українсько-японських проектів ДФФД України (2013-2014рр., 2018-2019 рр.) та українсько-турецького проекту НАН України (2011-2012 рр.).

Наукова новизна отриманих результатів. Під час виконання дисертаційного дослідження автор отримав цілу низку даних, які суттєво доповнюють та розвивають сучасні уявлення про молекулярні механізми взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами та його терапевтичне застосування у випадку нейродегенеративних захворювань.

Зокрема, Шульгою С.М. продемонстровано результати комп'ютерного моделювання щодо утворення та функціонування β -амілоїдних пептидів (A β) під час розвитку хвороби Альцгеймера; вивчено специфічні взаємодії між A β у β -амілоїдних гексамерах, нонамерах та фібрилах; запропоновано модель та механізм агрегації A β ; вперше запропоновано назальне застосування ліпосомальної форми куркуміну для подолання запальних процесів за нейродегенеративних захворювань.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати мають фундаментальне значення, зокрема розширюють уявлення про механізми взаємодії мономерів амілоїдних пептидів, куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера. Автором вивчено специфіку взаємодії між A β у гексамерах та фібрилах, оцінено конформаційні зміни β -амілоїдних мономерів у β -амілоїдних нонамерах, вплив іонів Zn на структуру β -амілоїдних наномерів, взаємодію між A β та похідними куркуміну. Встановлено терапевтичні ефекти куркуміну у тварин з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера (Патент на корисну модель № 129295, 2018). Розроблено методики виділення, ідентифікації та кількісного визначення фосфоліпідів із знежиреного лецитину соняшника (впроваджено у промислове виробництво ТОВ «НВФ БІОЛЕР», м. Дніпро; Акт впровадження від 08.02.2017 р.; Декларація про готовність до експлуатації об'єкта № ДП143160491104 від 18.02.2016 р.). Результати досліджень використовуються у навчальному процесі та науково-дослідних роботах студентів спеціальності «Фармакологія і фармація» у Дніпропетровській медичній академії (Акт впровадження № 1 від 07.06.2017 р., акт впровадження № 2/12-17 від 20.12.2017 р.) та на фармацевтичному факультеті Запорізького державного медичного університету (Акт впровадження від 04.09.2017 р.).

Особистий внесок здобувача. Автором здійснено пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, наукову інтерпретацію одержаних результатів та їх узагальнення, сформульовано основні висновки. Автор брав участь у дослідженнях гепатопротекторної та нейротропної дій знежиреного лецитину соняшника, аналізі стабільності ліпосом, моделюванні хвороби Альцгеймера та оцінці ступеня впливу ліпосомальної форми куркуміну в експериментальних тварин на про- та антизапальні інтерлейкіни,

молекулярному моделюванні утворення і взаємодії мономерів Аβ у різних модельних системах, впливу іонів Zn на структуру β-амілоїдних наномерів. Спільно з науковим консультантом д.б.н., проф., академіком НАН України Я.Б. Блюмом проаналізовано одержані результати роботи та підготовлено їх до друку.

Апробація результатів дисертаційної роботи. Основні результати досліджень були представлені на: щорічних конференціях Американського Товариства Хіміків Жирів (103 AOCS, 2012, Лонг Бич; 105 AOCS, 2014, Сан Антоніо, США; 104 AOCS 2013, Монреаль, Канада); X міжнародному конгресі з фосфоліпідів (10th ILPS, 2011, Роттердам, Нідерланди); VI та VII Міжнародному конгресі «Біотехнологія: стан і перспективи розвитку» (2011, 2013, Москва, РФ); Міжнародних конференціях (2003, 2013, Дніпропетровськ, 2012, Одеса), Міжнародній конференції «Химия, Био- и Нанотехнологии» (2013, Щолкіно, АР Крим), 15 Європейському конгресі з біотехнології (2012, Стамбул, Туреччина); 11 Конгресі Європейської федерації ліпідів (2012, Стамбул, Туреччина); V Міжнародному симпозиумі МАСС-5 (2013, Харків); XXIII Українській конференції з органічної хімії, присвяченій 95-річчю заснування НАН України (2013, Чернівці); Міжнародній конференції «Успіхи інформатики, комп'ютерного моделювання та обчислювальної техніки» (2016, Пенанг, Малайзія); Міжнародній конференції «Успіхи інформатики: концепції, теорія та застосування (ICAICTA2017)» (2017, Кута, Індонезія). Результати дисертаційної роботи доповідалися на наукових семінарах відділів промислової та харчової біотехнології, геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України».

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Шульги С.М. є закінченим науковим дослідженням, виконаним на високому методичному рівні. Сформульовані автором основні наукові положення та висновки підтверджено значною кількістю теоретичних *in silico* та експериментальних *in vitro* та *in vivo* досліджень. Автор використав сучасні методи дослідження: високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ), сканувальну електронну та атомно-силову мікроскопію, мас-спектроскопію, лазерно-кореляційну та

спектрофотометричну спектроскопію, електронний парамагнітний резонанс (ЕПР), імуноферментний аналіз, методи молекулярної динаміки та квантової хімії *ab initio* тощо.

Для оцінки достовірності експериментальних даних застосовано методи варіаційної статистики ANOVA з використанням t-критерію Стьюдента. Обсяг проведених досліджень, їх інформативність дозволили досягти високого ступеня обґрунтованості наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації.

Повнота викладу результатів роботи у наукових публікаціях.

Отримані результати викладено у 53 наукових працях, зокрема, у 27 статтях у фахових періодичних виданнях, з яких 10 опубліковано у виданнях першого і другого кварталів (Q1 і Q2) класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, двох монографіях, одному патенті України на винахід та 6 патентах України на корисну модель, а також у 17 тезах доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів та з'їздів.

Зміст дисертаційної роботи. Дисертацією Шульги С.М. є сукупність наукових статей за обраною тематикою з аналізом сучасного стану проблеми та запропонованим біотехнологічним підходом у терапії амілоїдної патології.

У вступній частині дисертаційної роботи обґрунтовано актуальність дослідження щодо необхідності створення ліпосомальних форм біологічно-активних інгредієнтів та дослідження молекулярних механізмів взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера, коректно сформульовані мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження, підкреслена наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення.

Основну увагу у роботі було приділено дослідженню молекулярних механізмів взаємодії між β -амілоїдними пептидами у β -амілоїдних гексамерах та фібрилах, оцінці конформаційних змін β -амілоїдних мономерів у β -амілоїдних нонамерах, впливу іонів Zn на структуру β -амілоїдних наномерів, взаємодії між β -амілоїдними пептидами та похідними куркуміну за використання методів молекулярного моделювання, а також терапевтичного впливу похідних куркуміну на розвиток хвороби Альцгеймера у системі *in vivo*.

Автором представлено такі нові результати:

- розроблено технологію виділення фосфоліпідів з фосфатидного концентрату олії соняшника шляхом трьохстадійної обробки ацетоном і фільтрацією після кожної стадії;

- оцінено макрокомпонентний склад сухого знежиреного лецитину сої та соняшника за використання методу ВЕРХ;

- отримано одно- та багатошарові ліпосоми форми АТР методом заморожування-танення (великі одношарові везикули - LUV), а для ліпосомальної форми куркуміну – екструзію через мембрани (малі одношарові везикули - SUV) та оцінено їх стабільність за допомогою сканувальної електронної та атомно-силової мікроскопії;

- визначено жирнокислотний склад ліпосом лецитину яєчного жовтка, соняшника та сої, оцінено їх стабільність за допомогою метода ЕПР та використання нітросильних радикалів як спінових зондів;

- методом молекулярної динаміки оцінено стабільність ліпосом («крупнозерниста» модель) за двома типами: (i) моделі з однаковим числом (SNL) – однакова кількість молекул фосфоліпідів, розташованих на внутрішньому і зовнішньому шарах мембрани ліпосом та (ii) модель з однаковою щільністю (SDL) – однакова кількість молекул фосфоліпідів у внутрішньому та зовнішньому шарах ліпосоми;

- отримано та охарактеризовано ліпосомальну форму аденозин-5-трифосфату для перорального застосування;

- отримано та охарактеризовано ліпосомальну форму куркуміну;

- методом молекулярної динаміки досліджено специфічні взаємодії між β -амілоїдними пептидами ($A\beta$) у β -амілоїдних гексамерах, нонамерах та фібрилах, запропоновано модель та механізм агрегації $A\beta$;

- оцінено вплив іонів Zn на структуру та електронні стани β -амілоїдних наномерів;

- вивчено специфічні взаємодії інгібіторів з бактеріальним білком FtsZ;

- вивчено взаємодію куркуміну та його похідних з β -амілоїдним пептидом методом *ab initio*;

- вивчено взаємодію похідних куркуміну з Тау протеїном і FtsZ протеїном методом *ab initio*;

- вивчено взаємодію куркуміну із сайтами рестрикції $A\beta$ PP;

- вивчено вплив $A\beta_{42}$ на динаміку експресії і утворення $A\beta_{40}$, $IL-1\beta$, $TNF\alpha$, $IL-6$, $IL-10$ у мононуклеарах, а також когнітивні характеристики щурів з моделлю хвороби Альцгеймера та її корекцію куркуміном.

- доведено, що назальна терапія куркуміном у ліпосомальній формі для щурів з моделлю доклінічного етапу хвороби Альцгеймера (інтрагіпокампальне введення гомоагрегатів $A\beta_{42}$) спричиняла пригнічення ангіотензин перетворювальної активності та виявляла більший антицитокіновий потенціал у гіпокампі тварин, що супроводжувалося відновленням показників їх пам'яті.

В авторефераті викладено основні розділи дисертаційної роботи, одержані результати обговорено, зроблено висновки, а в анотації роботи стисло викладена її суть.

Висновки роботи відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

При ознайомленні з роботою виникли деякі **зауваження і запитання** дискусійного характеру, які жодним чином не впливають на високу позитивну оцінку представленої дисертації.

Зауваження до дисертації.

1. У тексті автор часто використовує «кальки» іншомовних термінів. Також мають місце невдалі стилістичні вирази і описки.

2. Для кращого сприйняття представлених результатів необхідно було зробити підписи рисунків (Рис. 2-4) більшого розміру, а також українською мовою.

3. Відсутній статистичний аналіз даних, представлених у Табл. 5-7.

Запитання до дисертанта.

1. Що відомо про вплив інших іонів металів, зокрема міді та заліза, на структуру β -амілоїдного пептиду?

2. З тексту роботи не зрозумілим є проведення дослідження взаємодії саме інгібіторів Zantrin Z3 та диметил ZZ3 з бактеріальним білком FtsZ та яким чином пов'язані хвороба Альцгеймера і туберкульоз у представленій роботі?

3. Як довго є стабільною створена транспортна наносистема на основі есенціальних фосфоліпідів олії соняшника з часом, тобто який її термін застосування від моменту виготовлення? Чи потрібно використовувати лише

свіжоприготовлену суміш? Чи досліджували її стабільність залежно від зміни рН середовища?

Висновок.

На основі вищевикладеного вважаю, що дисертаційна робота «Створення транспортних наносистем на основі есенціальних фосфоліпідів олії соняшника для посилення біологічних ефектів куркуміну», де розділами є публікації здобувача (у кількості не менше 10 у виданнях, віднесених до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports), є завершеним оригінальним науковим дослідженням, яке за актуальністю, новизною, важливістю, достовірністю, а також практичною цінністю одержаних наукових результатів відповідає вимогам пп. 9, 10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ № 567 від 24.07.2013 р. зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р., № 567 від 27.07.2016 р., № 943 від 20.11.2019 р. та № 607 від 15.07.2020 р., Вимогам до оформлення дисертації, затверджених наказом МОН України від 12.01.2017 р. № 40, зареєстрованого у Міністерстві юстиції України 03.02.2017 р. за № 155/30023 щодо докторських дисертацій, а її автор, **Шульга Сергій Михайлович**, заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія.

Офіційний опонент

в.о. завідувача кафедри фізіології,
біохімії рослин та біоенергетики
Національного університету біоресурсів
і природокористування України,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник

С.В. Прилуцька

