

## ВІДГУК

офіційного опонента Рибальченко Володимира Корнійовича на докторську 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 досліджень.* В сучасному світі існує проблема нових засобів профілактики, терапії та попередження нейродегенеративних захворювань. На жаль, досі медицина не має ефективних засобів лікування хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Гентінгтона. Більшість препаратів можуть лише трохи сповільнити перебіг хвороби, але не здатні зупинити руйнування синаптичних зв'язків і функціонування нейрональних мереж, які відповідають за когнітивні процеси і механізми пам'яті, що веде до слабоумства і смерті пацієнтів. У зв'язку з цим існує нагальна необхідність дослідження молекулярних механізмів ініціації, перебігу і регуляції амілоїдогенезу з метою розробки нових науково обґрунтованих підходів до його лікування з використанням новітніх досягнень біомедицини. Як основний компонент терапії амілоїдозу і когнітивних порушень у випадку хвороби Альцгеймера в роботі розглянуто флавоноїди (куркумін і його похідних) та комплексно досліджено молекулярні та структурно біологічні механізми специфічної взаємодії з амілоїдними та мікобактеріальними пептидами.

Докторська робота Шулги С.М, вирішує актуальні проблеми специфічності взаємодії між  $\beta$ -амілоїдними пептидами та похідними куркуміну. Відзначено терапевтичний ефект похідних куркуміну у випадку хвороби Альцгеймера. В дисертації на моделях *in vitro* та *in vivo* у випадку доклінічного етапу хвороби Альцгеймера показано вплив гомоагрегатів  $\beta$ -амілоїдного пептиду  $A\beta(1-42)$  на суспензію мононуклеарів людини (модель *in vitro*) та на гіпокамп щурів (модель *in vivo*). Експериментально підтверджено антиамілоїдогенну і протизапальну роль ліпосомальної форми куркуміну.

Докторська робота Шульги С. М. новаторська, представлена як наукова доповідь.

Докторська робота виконана 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.** Автором проведено пошукові, скринінгові дослідження фосфоліпідів різного рослинного походження. За допомогою спінових зондів вперше визначено стабільність ліпосом з фосфоліпідів соняшника, та показано їх істотну стабільність в умовах ініційованого окиснення в порівнянні з ліпосомами з фосфоліпідів сої та яєчного жовтка. Створено ліпосомальну форму аденозинтрифосфату (АТР) для перорального застосування та ліпосомальну форму куркуміну з фосфоліпідів соняшника для назального застосування і визначено ефективність їх включення. Вперше показано, що стабільність сольватованого гексамера А $\beta$  перш за все пов'язана з амінокислотними залишками (Arg5, Asp7, Glu22, Asp23 та Lys28) та існуванням мережі водневих зв'язків. Вперше показано зміну структури нонамера А $\beta$  у воді, яка пояснює причину стабільності А $\beta$ -нонамер. Встановлено, що куркумін може втручатися у процес утворення А $\beta$ -мономерів шляхом взаємодії з сайтами процесінгу А $\beta$ РР. Вперше показано ефективну дію назальної терапії ліпосомальної форми куркумін для щурів за моделі доклінічного етапу хвороби Альцгеймера, яка обумовлюється пригніченням ангіотензин перетворювальної активності, що призводило до відновлення показників пам'яті тварин. Вперше показано, що додавання куркуміну знімало ініціюючий ефект А $\beta$ <sub>42</sub> на мононуклеарів прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$  і TNF $\alpha$ ), токсична дія А $\beta$ <sub>42</sub> пригнічувала накопичення IL-10 в мононуклеарних клітинах, але не впливала на його секрецію. Показано, що додавання куркуміну відновлювало внутрішньоклітинний вміст цього протизапального інтерлейкіну.

**Практична цінність роботи.** Автором отримано результати які мають фундаментальне значення для деталізованого розуміння каскаду механізмів молекулярної та структурно біологічної взаємодії мономерів амілоїдних пептидів та взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера. Визначено молекулярний механізм взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами та досліджено застосування ліпосомальної форми куркуміну для пригнічення виникаючих запалень. Вагомість роботи полягає у формулюванні гіпотези щодо зв'язування куркуміну з фрагментом протеїну попередника  $\beta$ -амілоїдних пептидів (A $\beta$ PP<sub>63</sub>Rat). Практичне значення дослідження полягає в розробленні нових біотехнологічних підходів для вивчення специфіки взаємодії між  $\beta$ -амілоїдними пептидами та похідними куркуміну. Автором показано вплив похідних куркуміну (як інгібіторів) на розвиток хвороби Альцгеймера. Терапевтичні ефекти, продемонстровані на експериментальних тваринах, відкривають нові можливості для розробки іноваційних методів у боротьбі з запальними процесами нейродегенеративних захворювань а спрей ліпосомальної форми куркуміну після проведення відповідних доклінічних і клінічних випробувань можна рекомендувати для впровадження в лікувальну практику.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 381 сторінці комп'ютерного тексту. Включає вступ, п'ять основних розділів, висновки, додаток.

У **Вступі** наведено актуальність досліджень, мета та завдання, об'єкт, предмет дослідження, наукову новизну і практичне значення одержаних результатів. Наведено дані про апробацію результатів дисертації та публікаційну активність автора.

У **першому розділі** докторант за даними наукових літературних джерел вітчизняних та зарубіжних авторів представляє аналіз різних способів отримання і властивостей сухої знежиреної суміші есенціальних фосфоліпідів (лейцитину) олії соняшника. Показані способи виділення фосфоліпідів із

фосфатидного концентрату. Продемонстровано властивості і застосування сухого знежиреного лецитину.

*Другий розділ* «Структура та властивості транспортних наносистем (ліпосом) з фосfolіпідів олії соняшника» містить данні щодо методів отримання одношарових та багатошарових ліпосом. Детально представлено опис та характеристики ліпосом, лабораторних методів підготовки сировини для виготовлення ліпосом, а також визначення стабільності ліпосом.

*Розділ 3.* «Створення і характеристики ліпосомальних форм активних фармацевтичних інгредієнтів» характеризує результати виявлення та створення ліпосомальних форм активних фармацевтичних інгредієнтів. Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми аденозин-5-трифосфату для перорального застосування. Методи отримання і характеристика ліпосомальної форми куркуміну. Встановлено, що для створення ліпосомальної форми АТФ найбільш придатний метод заморожування–танення, а для куркуміну – методи сонікації та екструзії через мембрани (ефективність включення 95-98%).

*У розділі 4* «Молекулярні та структурно-біологічні механізми специфічної взаємодії амілоїдних пептидів» представлено подальші дослідження специфічної взаємодії між  $\beta$ -амілоїдними пептидами в  $\beta$ -амілоїдних гексамерах. Показано конфірмаційні зміни  $\beta$ -амілоїдних мономерів в  $\beta$ -амілоїдних нонамерах. Вказано специфічність взаємодії між  $\beta$ -амілоїдними пептидами в  $\beta$ -амілоїдних фібрилах. З'ясовано, що заряджені амінокислотні залишки, такі як Arg5, Asp7, Glu22, Asp23 та Lys28 в основному сприяють взаємодії між парами мономерів і взаємодії молекул води, що утворюють мережі водневих зв'язків між зарядженими залишками та підвищують стабільність сольватованого гексамера А $\beta$ . Продемонстровано вплив іона Zn на структуру та електронні стани  $\beta$ -амілоїдних наномерів. Показано зміну структури та взаємодії між мономерами А $\beta$  в нонамерах А $\beta$  з та без іонів Zn. Доведено специфічність взаємодії інгібіторів з бактеріальним білком FtsZ.

*У розділі п'ять* «Механізми молекулярної взаємодії куркуміну і його похідних з амілоїдними пептидами у моделях хвороби Альцгеймера»

розміщено результати з взаємодії куркуміну та його похідних з  $\beta$ -амілоїдним пептидом за молекулярного моделювання методом *ab initio*. Показано взаємодія похідних куркуміну з Тау протеїном за докінгу та молекулярного моделювання методом *ab initio*. Продемонстровано взаємодію похідних куркуміну FtsZ протеїном за докінгу та молекулярного моделювання методом *ab initio*. Визначено взаємодію куркуміну з сайтами рестрикції А $\beta$ PP. За допомогою методів докінгу і молекулярної динаміки встановлено що куркумін може втручатися у процес утворення А $\beta$ -мономерів шляхом взаємодії з сайтами процесінгу попередника  $\beta$ -амілоїдних пептидів (А $\beta$ PP\_63Rat). Показано динаміку експресії та утворення А $\beta$  (40), IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 за впливу А $\beta$  (42) у мононуклеарах. Охарактеризовано когнітивні характеристики щурів із моделлю хвороби Альцгеймера та визначення їх корегування за куркуміну. Показано, що назальна терапія куркуміном у ліпосомальній формі для щурів з моделлю доклінічного етапу хвороби Альцгеймера (інтрагіпокампальне введення гомоагрегатів А $\beta$ <sub>42</sub>) обумовила пригнічення ангіотензин перетворювальної активності та виявила більший антицитокіновий потенціал у гіпокампі щурів.

Автором проведено узагальнення отриманих результатів, а саме: результати комплексного дослідження молекулярних механізмів молекулярної та структурно біологічної взаємодії амілоїдних пептидів та взаємодії куркуміну з амілоїдними пептидами у випадках моделювання хвороби Альцгеймера. З'ясовано молекулярний механізм такої взаємодії та запропоновано використання куркуміну в ліпосомальній формі для пригнічення виникаючих запалень.

Загальні висновки завершують роботу. Апробація результатів досліджень пройшла на конференціях різного рівня, результати досліджень викладено у 53 публікаціях, з них у 27 статтях, зокрема, у 10 статтях опублікованих у виданнях першого і другого кварталів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, 2 монографіях, 1 патенту на винахід і 6 патентах на корисну модель та 17 тезах конференцій і з'їздів. 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 Вступі використана література датується «наймолодша» 2017 роком, вся інша до 2010, невже зараз не проводяться в світі подібні дослідження з ліпосомальних форм ліків або властивостей куркуміну?
2. В роботі описано антицитокиновий ефект куркуміну, але на жаль, не має гіпотез/пропозицій використання куркуміну як лікувальної форми цитокинового шторму COVID 19. Це б додало вагомості роботи.
3. В узагальненні результатів досліджень не має порівняння з світовими дослідженнями за тими чи іншими напрямками (ліпосомальними формами, дослідження куркуміну, вивченням хвороби Альцгеймера тощо). Це б показало вагомість досліджень на світовому рівні та розширило кількість посилань.

#### **Запитання до дисертанта.**

1. За рахунок чого забезпечується стерильність ліпосомальних форм куркуміну?
2. Який куркумін використовував автор у дослідженнях?
3. Чи можна вважати, що до клінічні випробування ліпосомальної форми АТФ на щурах проведені в повному обсязі у відповідності до чинних вимог?

#### **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 квартилів (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,  
Головний науковий співробітник  
Інституту високих технологій  
Київського національного  
університету  
ім. Тараса Шевченка

доктор біологічних наук, професор,  
Заслужений діяч науки і техніки  
України В. К. Рибальченко

«21» квітня 2021 р.

Підпис В.К. Рибальченка засвідчую



Директор Інституту  
високих технологій  
Київського національного  
університету імені Тараса  
Шевченка  
Шульга В.В.