

АНОТАЦІЯ

Юлія КУЛІШ. Вплив вуглецевих наночастинок на експресію генів транскрипційних факторів та мікроРНК. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2025.

Дисертація присвячена вивченню молекулярних механізмів дії вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену (GrO) та одностінні вуглецеві нанотрубки (SWCNTs), на експресію генів важливих транскрипційних та регуляторних факторів і мікроРНК у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, а також у клітинах гліобластоми лінії U87MG для виявлення чутливості нормальних і пухлинних клітин до дії цих наночастинок і з'ясування значення стресу ендоплазматичного ретикулула (ER) у молекулярних механізмах їх дії.

Актуальність теми пов'язана з постійно зростаючим застосуванням різних за природою і структурою наночастинок у різноманітних галузях, у тому числі у біології та медицині, зокрема для діагностики і лікування онкологічних захворювань, а також багатьох інших патологій. Вуглецеві наночастинок вважаються найбільш перспективними завдяки високій стабільності та великій різноманітності їх структури. Разом з тим, молекулярні механізми їх впливу на клітини злоякісних пухлин і функціонування геному в них залишаються ще недостатньо з'ясованими, а ще менше відомо про можливий вплив вуглецевих наночастинок, як і наночастинок іншої природи, на нормальні клітини організму, тим паче на клітини головного мозку. На даний момент уже є дані про численні негативні наслідки застосування вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену та SWCNTs. Це є особливо важливим попередженням до застосування вуглецевих наночастинок для лікування злоякісних

новоутворень, оскільки користь від такого лікування повинна перевищувати можливу потенційну шкоду, яка може бути завдана здоровим клітинам організму. І саме тому, на першому плані має стояти поглиблене і всебічне вивчення молекулярних механізмів дії не лише вуглецевих, а й інших, різних за природою, наночастинок на нормальні клітини всіх органів та тканин організму. І лише за умов відсутності негативних ефектів, можна розглядати можливість їх використання у біології і медицині.

Вірогідним молекулярним механізмом дії на клітини наночастинок різної природи та структури є стрес ER. Він підтримує гомеостаз, а за умов дії різних токсичних речовин, підтримує життєдіяльність клітин змінюючи метаболічні процеси і збільшуючи життєздатність клітин, їх адаптацію до нових умов існування. У випадку довготривалих і тяжких негативних впливів – призводить до запуску спеціальної, специфічної для ER, програми загибелі клітин або утворення та росту злоякісних пухлин.

Важливим завданням цієї роботи було дослідити вплив вуглецевих наночастинок, таких як оксид графену та одностінні вуглецеві нанотрубки на експресію генів залежних від стресу ER транскрипційних та інших факторів у нормальних астроцитах людини (NHA/TS) та клітинах гліобластоми, з метою порівняти чутливість експресії досліджених генів до впливу вуглецевих наночастинок у звичайних та пухлинних клітинах. Для вивчення механізмів впливу вуглецевих наночастинок на клітини головного мозку були проведені дослідження по виявленню змін в експресії мікроРНК у астроцитах та ембріонах рибки *Danio rerio*, використовуючи наявні у відділі препарати РНК із цих ембріонів. Отримані результати сприяють розшифровці механізмів появи різних порушень за умов використання цих наночастинок як для діагностичних, так і терапевтичних цілей, зокрема, для терапії онкологічних захворювань.

Для виконання дисертаційної роботи були задіяні новітні біохімічні та молекулярно-біологічні методи: вирощування клітин, отримання РНК, визначення спектрів поглинання РНК на спектрофотометрі, синтез кДНК з

використанням зворотної транскриптази, методи кількісної ПЛР у реальному часі, зворотної транскрипції мікроРНК, аналіз ампліфікатів електрофорезом у агарозному гелі, методи біоінформатики і статистики отриманих результатів.

Для з'ясування впливу наночастинок оксиду графену та SWCNTs на ННА/ТС і клітини гліобластоми на рівні ми провели дослідження рівня експресії генів, що кодують ключові транскрипційні фактори: **DDIT3** (DNA Damage Inducible Transcript 3), відомий ще як CHOP або GADD153, **ATF3** (Activating Transcription Factor 3), **ATF4** (Activating Transcription Factor 4), **E2F1** (E2F Transcription Factor 1), **TP53** (Tumor Protein 53), **TFPI2** (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2) та **ZNF395** (Zinc Finger Protein 395), а також важливі, залежні від стресу EP, регуляторні фактори та ензими: **HBEGF** (Heparin binding epidermal growth factor like growth factor), також відомий як рецептор дифтерійного токсину, **TOB1** (Transducer of ERBB2, 1), **DNAJB9** (DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9), **HSPA5** (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5), **EDEM1** (ER Degradation-Enhancing Alpha-Mannosidase-Like Protein 1), **P4HA1** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1), **P4HA2** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 2), **IDH2** (Isocitrate Dehydrogenase), **AK3** (Adenylate kinase 3), **PTGS2** (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), **GJA1** (Gap Junction Protein Alpha 1), **KRT18** (Keratin 18) і **MEST** (Mesoderm Specific Transcript). Для цього були вибрані відносно малі дози як оксиду графену (1 та 4 нг/мл), так і одностінних вуглецевих нанотрубок (2 та 8 нг/мл). Варто відмітити, що більшість із досліджених генів є поліфункціональними та тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума та розвитком канцерогенезу, а це є важливим для в'яснення генотоксичної дії вуглецевих наночастинок на нормальні астроцити у порівнянні з клітинами гліобластоми. Для вирішення проблеми про роль стресу EP у механізмах дії вуглецевих наночастинок на функціональну активність геному були також використані клітини гліобластоми з пригніченим ERN1, основним сигнальним протеїном стресу

ЕР, який контролює експресію сотень генів, у тому числі й генів транскрипційних факторів.

У зв'язку з тим, що мікроРНК є важливими регуляторами експресії численних мРНК на пост-транскрипційному рівні і задіяні у нейрогенезі, причому зміни в їх експресії можуть впливати на рівень експресії обраних нами мРНК транскрипційних факторів, а також інших регуляторних факторів та ензимів, були також проведені біоінформаційні дослідження по виявленню сайтів зв'язування мікроРНК з 3'-нетранслюємими ділянками мРНК і з'ясуванню впливу оксиду графену та одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії деяких мікроРНК.

МікроРНК є важливими регуляторами розвитку головного мозку, а тому для в'яснення можливої дії вуглецевих нанотрубок на клітини мозку ми провели вивчення впливу малих доз цих вуглецевих наночастинок на рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p, які тісно пов'язані з контролем метаболізму, нейрогенезом та проліферацією клітин, у ембріонах рибок *Danio rerio*.

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії таких транскрипційних факторів як DDIT3, ATF3 і TP53 у нормальних астроцитах людини є дуже чутливим до дії на них наночастинок оксиду графену у дозі як 1, так і 4 мкг/мл, причому експресія *DDIT3* та *ATF3* посилювалася, а *TP53* – знижувалася. Рівень експресії інших досліджених транскрипційних факторів у нормальних астроцитах також підвищувався, але у меншій мірі і дозо-залежно. У той же час, рівень експресії усіх досліджених генів транскрипційних факторів у клітинах гліобластоми за дії на них тих же доз наночастинок оксиду графену був значно меншим порівняно з нормальними астроцитами, хоча направленість змін була подібною. Ці результати є принципово новими і важливими, оскільки демонструють значно більшу чутливість нормальних клітин порівняно з пухлинними клітинами до дії наночастинок оксиду графену, що може бути обумовлено полі-резистентністю клітин гліобластоми.

Результати досліджень багатьох авторів вказують на причетність сенсорно-сигнальних шляхів стресу ER, як відповіді на неправильно згорнуті протеїни, до прояву токсичної дії наночастинок. Саме тому ми провели досліди на пухлинних клітинах, а саме гліобластоми, із пригніченими протеїназною і ендорибонуклеазною активностями протеїну ERN1, що опосередковує реакцію на стрес ER. Було показано, що у таких клітинах гліобластоми чутливість експресії усіх досліджених нами генів транскрипційних факторів до дії оксиду графену різко зменшується порівняно з тими клітинами гліобластоми, які мали нативний протеїн ERN1. Це вказує на опосередкованість впливу наночастинок оксиду графену на експресію генів транскрипційних факторів стресом ER, зокрема ERN1.

Аналогічні результати були отримані при дослідженні впливу оксиду графену на рівень експресії генів низки регуляторних факторів та ензимів, які продемонстрували значно більшу чутливість експресії цих генів у нормальних астроцитах порівняно до клітин гліобластоми, а також опосередкованість ERN1 ефектів оксиду графену на експресію генів.

Методами біоінформатики було виявлено сайти зв'язування мікроРНК miR-182-5p з мРНК *HBEGF* та *TOBI* і проведено дослідження рівня експресії цієї мікроРНК за дії наночастинок оксиду графену на нормальні астроцити і клітини гліобластоми. Встановлено, що рівень miR-182-5p знижується за дії оксиду графену дозо-залежно як у нормальних астроцитах, так і клітинах гліобластоми, але у нормальних клітинах більш виражено. Оскільки мікроРНК miR-182-5p має сайти зв'язування на 3'-последовностях мРНК *HBEGF* та *TOBI*, то важливо відмітити, що зниження рівня експресії цієї мікроРНК асоціюється з підвищеною експресією як мРНК *TOBI*, так і мРНК *HBEGF*. Ці результати вказують на можливість і пост-транскрипційної регуляції експресії мРНК *HBEGF* та *TOBI* під впливом оксиду графену на ННА/TS і клітини гліобластоми.

Окрім того, вперше було показано, що вуглецеві нанотрубки також проявляють виражений вплив на рівень експресії низки транскрипційних та

інших регуляторних факторів, які задіяні у регуляції проліферації клітин, як у нормальних клітинах, так і у клітинах гліобластоми, причому пухлинні клітини були менш чутливими до дії цих вуглецевих наночастинок. Можна припустити, що це обумовлено полі-резистентністю клітин гліобластоми, яка детермінується саме стресом ER. Виявлена залежність впливу цих наночастинок на експресію досліджених генів від протеїну ERN1.

Так, результати дослідження впливу вуглецевих наночастинок на нормальні астроцити та клітини гліобластоми вперше продемонстрували їх гено-специфічний характер дії на експресію низки генів, асоційованих з контролем процесів метаболізму та проліферації клітин. Важливо відмітити, що дія наночастинок графену була більшою у порівнянні з дією вуглецевих нанотрубок. Більшість із досліджених нами генів є полі-функціональними і асоційовані з ростом злоякісних пухлин. Відомо також, що зниження рівня експресії деяких із цих генів сприяє пригніченню не лише проліферації клітин, а і їх метастазування.

Таким чином, зміни в експресії мРНК та мікроРНК саме у нормальних астроцитах можуть започаткувати розвиток змін у нервовій системі. Проведені нами дослідження рівня експресії мікроРНК у ембріонах рибок *Danio rerio* за дії різних концентрацій вуглецевих нанотрубок показали, що уже через 24 години спостерігається дозо-залежне зниження експресії мікроРНК miR-19a-3p та miR-21-5p, а через 72 години – різке пригнічення експресії не лише цих мікроРНК, а і miR-96-5p, причому ці результати добре узгоджуються з появою у головному мозку ембріонів виражених токсичних проявів й істотно залежали від дози нанотрубок.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає у виявленні істотних змін рівня експресії генів важливих транскрипційних і регуляторних факторів, що контролюють процеси метаболізму та проліферації клітин, у нормальних і пухлинних клітинах за дії на них наночастинок оксиду графену і SWCNTs, причому їх ефект був значно сильнішим у нормальних астроцитах в порівнянні з клітинами гліобластоми лінії U87MG. Також

вперше було показано, що дія цих вуглецевих наночастинок на експресію різних генів переважно опосередковується стресом ендоплазматичного ретикулула, оскільки за умов пригнічення ERN1, головного сигнального шляху цього стресу, ефект як наночастинок GrO, так і SWCNTs, істотно зменшувався. Отримані результати продемонстрували вагому роль ензиматичної активності ERN1 у контролі експресії стрес-залежних транскрипційних факторів (*DDIT3*, *ATF3*, *ATF4*, *E2F1* та *TP53*), так і важливих регуляторних факторів та ензимів (*DNAJB9*, *HBEGF*, *TOB1*, *EDEM1*, *DDX58*, *P4HA2*, *TFPI2* і *IDH2*). Вперше показано, що наночастинок оксиду графену впливають на рівень експресії мікроРНК, які є важливими регуляторами експресії генів *HBEGF*, *TOB1* та *TP53* на пост-транскрипційному рівні за рахунок наявності в їх мРНК специфічних сайтів зв'язування, оскільки збільшення рівня мРНК *HBEGF* і *TOB1* узгоджувалося зі зниженням рівня специфічної до них мікроРНК *miR-182-5p*, а зменшення рівня експресії мРНК *TP53* – із підвищенням *miR-96-5p*.

Вперше встановлено, що NHA/TS проявляють більшу чутливість до дії наночастинок оксиду графену та одностінних вуглецевих нанотрубок на рівні експресії генів ключових транскрипційних факторів і стрес-залежних протеїнів, якщо порівнювати з клітинами гліоми. Так, під впливом наночастинок оксиду графену і одностінних вуглецевих нанотрубок рівень експресії генів *DDIT3*, *ATF3* та *DNAJB9* змінюється у нормальних астроцитах більш виражено порівняно з клітинами гліобластоми як за дії менших, так і більших доз цих вуглецевих наночастинок, причому знижена чутливість клітин гліобластоми до їх дії може бути обумовлена полі-резистентністю пухлинних клітин, обумовлених стресом ER.

Практичне значення отриманих нами результатів визначається тим, що клітини гліобластоми менш чутливі до впливу наночастинок оксиду графену та SWCNT порівняно з NHA/TS, що оцінювалося за рівнем експресії генів ключових транскрипційних і регуляторних факторів. Цей результат є дуже важливим попередженням до використання досліджених

нами вуглецевих наночастинок у біомедицині без детального вивчення їх можливого впливу на різні нормальні клітини організму, на функціональну активність геному в них. Варто відмітити, що зміни в експресії важливих транскрипційних і регуляторних факторів, які індуюються наночастинками оксиду графену та SWCNTs, дають можливість виявляти досить чутливі генетичні маркери порушення метаболічних процесів, а це є важливим для виявлення небезпечних для здоров'я побічних ефектів.

Отримані результати досліджень вказують на вагомість виявлення молекулярних механізмів дії наночастинок оксиду графену і вуглецевих нанотрубок при оцінці біологічної безпеки їх застосування для різних цілей у біології та медицині, оскільки за дії як наночастинок оксиду графену, так і одностінних вуглецевих нанотрубок істотно порушується експресія генів важливих, контролюючих метаболізм транскрипційних та регуляторних факторів шляхом змін у функціонуванні геному опосередковано через стрес ER. Ідентифіковані зміни в експресії як мРНК, так і мікроРНК, можуть віддзеркалювати можливі механізми розвитку різних патологічних станів на молекулярному рівні та можуть використовуватися для визначення токсичної дії наночастинок.

Ключові слова: вуглецеві наночастинки, експресія генів, транскрипційні фактори, мікроРНК, HBEGF, TOB1, АСТВ, пригнічення ERN1, мРНК, кількісна ПЛР, геном, стрес, ендоплазматичний ретикулум, нормальні астроцити, пухлинні клітини.

ANNOTATION

Kulish Y.V. The effect of carbon nanoparticles on the expression of genes of transcription factors and microRNA. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree, in specialty 091 “Biology” – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation is devoted to the study of the molecular mechanisms of action of carbon nanoparticles, such as graphene oxide and single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), on gene expression of important transcription factors and microRNAs in normal human astrocytes of the NHA/TS line, as well as in glioblastoma cells of the U87MG line to elucidate the sensitivity of normal and tumor cells to the action of these nanoparticles and to elucidate the significance of endoplasmic reticulum (ER) stress in the molecular mechanisms of their action.

The significance of this work is linked to the constantly growing use of nanoparticles of different natures and structures in various fields, including biology and medicine, in particular for cancer diagnosis as well as treatment, and much other pathology. Carbon nanoparticles are considered the most promising due to their great constancy and diversity of structure. At the same time, the molecular mechanism of their influence on the cells of malignant tumors and their genome remains insufficiently elucidated. Even less is known about the possible influences of carbon nanoparticles, and nanoparticles of another nature, on normal cells of the body, including astrocytes. There is evidence of numerous negative consequences of carbon using nanoparticles, such as graphene oxide (GrO) and single-walled carbon nanotubes (SWCNTs). The benefits of using nanoparticles for treat tumors should significantly outweigh their negative effects on normal cells of the body. And that is why the in-depth and comprehensive study of the molecular mechanisms of action of not only carbon, but also other, different in nature, nanoparticles on normal cells of all organs and tissues of the

body should be in the foreground. And only then, under the conditions of the absence of negative effects, it is rational to ask questions about the possibility of their use in biology and medicine for certain purposes.

A possible molecular mechanism of action on cells of nanoparticles of various nature and structure is ER stress. It reliably maintains homeostasis, and under the influence of various toxic substances, it supports the vital activity of cells by altering metabolic processes and enhancing cell viability, thereby facilitating their adaptation to new conditions of existence. In the case of long-term and severe negative effects, it leads to the launch of a special, specific for endoplasmic reticulum cell death program or the formation and growth of malignant tumors.

An important task of this work was to investigate the effect of carbon nanoparticles such as graphene oxide and single-walled carbon nanotubes on the expression of genes of ER stress-dependent transcription factors and some key regulatory factors in normal astrocytes (NHA/TS) and tumor (glioblastoma) cells to detect the effect of carbon nanoparticles on normal and tumor cells in terms of the sensitivity of the expression of the studied genes. To clarify the mechanisms of the effect of carbon nanoparticles on brain cells, experiments were conducted to detect changes in microRNA expression in astrocytes and embryos of *Danio rerio*, using RNA preparations from these embryos available in the department. The results obtained clarify the molecular mechanisms of the appearance of various disorders when using these nanoparticles for both diagnostic and therapeutic purposes, in particular, for the treatment of oncological diseases.

To carry out the dissertation work, the latest biochemical and molecular biological methods were used: cell cultivation, RNA extraction, determination of RNA absorption spectra on a spectrophotometer, cDNA synthesis using reverse transcriptase, methods of quantitative real-time PCR, reverse transcription of microRNA, analysis of amplicates by agarose gel electrophoresis, methods of bioinformatics, and statistics of the obtained results.

To elucidate the effects of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs on NHA/TS and glioblastoma cells at the microscale, we conducted a study of the expression level of genes encoding key transcription factors: **DDIT3** (DNA Damage Inducible Transcript 3), also known as CHOP or GADD153, **ATF3** (Activating Transcription Factor 3), **ATF4** (Activating Transcription Factor 4), **E2F1** (E2F Transcription Factor 1), **TP53** (Tumor Protein 53), **TFPI2** (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2) and **ZNF395** (Zinc Finger Protein 395), as well as important ER stress-dependent regulatory factors and enzymes: **HBEGF** (Heparin binding epidermal growth factor like growth factor), also known as diphtheria toxin receptor, **TOB1** (Transducer of ERBB2, 1), **DNAJB9** (DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9), **HSPA5** (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5), **EDEM1** (ER Degradation-Enhancing Alpha-Mannosidase-Like Protein 1), **P4HA1** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1), **P4HA2** (Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 2), **IDH2** (Isocitrate Dehydrogenase), **AK3** (adenylate kinase 3), **PTGS2** (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), **GJA1** (Gap Junction Protein Alpha 1), **KRT18** (Keratin 18) and **MEST** (Mesoderm Specific Transcript). For this, relatively small doses of both graphene oxide (1 and 4 ng/ml) and SWCNTs (2 and 8 ng/ml) were selected. It is worth noting that most of the studied genes are poly-functional and strictly related to ER stress and carcinogenesis, and this is important for clarifying genotoxicity in the action of carbon nanoparticles on normal astrocytes compared to tumor (glioblastoma) cells. To resolution the problem of the role of ER stress in the mechanisms of action of carbon nanoparticles on the functional activity of the genome, glioblastoma cells with suppressed ERN1, the main signaling protein of ER stress, which controls the expression of hundreds of genes, including the important transcription factor genes, were also used.

In connection with the fact that microRNAs are important regulators of the expression of numerous mRNAs at the post-transcriptional level and are involved in neurogenesis, and changes in their expression can affect the expression level of the mRNAs of transcription factors selected by us, as well as other regulatory

factors and enzymes, we also conducted bioinformatics studies to identify miRNA binding sites with 3'-untranslated mRNA regions and to determine the impact of graphene oxide and SWCNTs on the levels of some miRNA expressions.

Since miRNAs play an important role in the development of the brain, to clarify the possible influence of carbon nanotubes on the growth of brain tissue, an investigation of the impact of these nanoparticles on the level of microRNAs miR-19a-3p, miR-21-5p and miR-96-5p expressions was conducted, which are closely related to metabolic control, neurogenesis and cell proliferation, in *Danio rerio* fish embryos.

The conducted studies established that the level of expression of such transcription factors as DDIT3, ATF3, and TP53 in normal human astrocytes is very sensitive to the effect on them of graphene oxide nanoparticles in a dose of both 1 and 4 ng/ml, and the expression of *DDIT3* and *ATF3* increased, and *TP53* - decreased. The expression level of other investigated transcription factors also increased, but to a lesser extent and dose-dependently. At the same time, the level of expression of all studied genes of transcription factors in glioblastoma cells under the influence of the same doses of graphene oxide nanoparticles was significantly lower compared to normal astrocytes, although the direction of changes was similar. These results are fundamentally new and important, as they demonstrate significantly greater sensitivity of normal cells compared to tumor cells to the action of graphene oxide nanoparticles, which may be due to the poly-resistance of glioblastoma cells.

Since numerous studies testify to the possibility of the involvement of signaling pathways of endoplasmic reticulum stress in the application of the genotoxic effect of nanoparticles, we led investigations using glioblastoma cells with inhibited enzymatic activities of the signaling protein ERN1, the main sensory and signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. It was shown by us that in such glioblastoma cells, the sensitivity of the expression of all the transcription factor genes we studied to the action of graphene oxide is

significantly reduced compared to those glioblastoma cells that had the native signaling protein ERN1. This indicates the indirect effect of graphene oxide nanoparticles on gene expression of transcription factors by ER stress, particularly by its signaling protein ERN1.

Similar results were obtained when studying the effect of graphene oxide on the level of gene expression of several regulatory factors and enzymes, which demonstrated a significantly greater sensitivity of the expression of these genes in normal astrocytes compared to glioblastoma cells, as well as the mediation of the revealed effects of graphene oxide on gene expression of ERN1, the main signaling protein ER stress.

Using bioinformatics methods, the binding sites of the microRNA miR-182-5p with the 3'-sequences of the *HBEGF* and *TOBI* mRNAs were identified, and the expression level of this miRNA under the action of graphene oxide nanoparticles on normal astrocytes and glioblastoma cells was studied. It was established that the level of miR-182-5p decreases under the action of graphene oxide in a dose-dependent manner in both normal astrocytes and glioblastoma cells, but is more pronounced in normal cells. Since miR-182-5p miRNA has binding sites on the 3'-sequences of *HBEGF* and *TOBI* mRNA, it is important to note that decreased expression of this miRNA is associated with increased expression of both *TOBI* mRNA and *HBEGF* mRNA. These results indicate the possibility of post-transcriptional regulation of *HBEGF* and *TOBI* mRNA expression under the action of graphene oxide on normal astrocytes and glioblastoma cells.

In addition, it was shown for the first time that carbon nanotubes also exert a marked effect on the level of several transcription and other regulatory factors expressions involved in the regulation of cell population proliferation, both in normal (NHA/TS) and in glioblastoma cells, and the tumor cells were less sensitive to these carbon nanoparticles action. It can be assumed that this is due to the poly-resistance of glioblastoma cells, which is determined by ER stress. The

dependence of the impact of different carbon nanoparticles on the studied gene expressions, specifically on the signaling protein ERN1, was also revealed.

Therefore, the results of our investigation of the influence of different carbon nanoparticles on normal cells (astrocytes) and glioblastoma cells demonstrated for the first time their gene-specific effect on the certain gene expressions associated with the control of metabolic processes and cell proliferation, and the impact of graphene nanoparticles was more noticeable compared to carbon nanotubes. It is worth noting that most of the genes we studied are poly-functional and associated with the growth of malignant tumors. It is also known that a decrease in the expression level of some of these genes contributes to cell proliferation and metastasis inhibition.

Thus, changes in mRNA and microRNA expression in normal astrocytes can initiate changes in the nervous system. Our studies of the level of miRNA in embryos of *Danio rerio* exposed to different doses of carbon nanotubes showed that after 24 hours there was a dose-dependent decrease in miR-19-3p and miR-21-5p miRNA expression, and after 72 hours – a sharp suppression of the expression of not only these microRNAs, but also miR-96-5p, and these results are well consistent with the appearance of pronounced neurotoxic effects in the brain of embryos at the early stages of embryonic development of the central nervous system and were dose-dependent.

The scientific innovation of the dissertation work lies in the identification of significant changes in the level of gene expression of important transcriptional and regulatory factors controlling the processes of metabolism and cell proliferation were detected in normal and tumor cells under the action of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs. Their effect was comparatively stronger in normal astrocytes than in U87MG glioblastoma cells. It was also shown for the first time that the effect of these carbon nanoparticles on the expression of various genes is mainly mediated by endoplasmic reticulum stress, since under conditions of inhibition of ERN1, the main signaling pathway of this stress, the effect of both graphene oxide nanoparticles and SWCNTs was

significantly reduced. Our results established the significant role of the enzymatic activity of ERN1 in controlling the expression of ER stress-dependent transcription factors (DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1 and TP53), as well as important regulatory factors and enzymes (DNAJB9, HBEGF, TOB1, EDEM1, DDX58, P4HA2, TFPI2 and IDH2). It was shown for the first time that graphene oxide nanoparticles affect the expression level of microRNAs, which are important regulators of HBEGF, TOB1, and TP53 gene expression at the post-transcriptional level due to the presence of specific binding sites in their mRNA, since the increase in *HBEGF* mRNA level and *TOB1* was consistent with a decrease in the level of their specific microRNA miR-182, and a decrease in the expression level of *TP53* mRNA - with an increase in miR-98.

It was first established that NHA/TS exhibit greater sensitivity to the action of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs at the level of gene expression of key transcription factors and stress-dependent proteins, when compared to glioma cells. Consequently, graphene oxide nanoparticles and SWCNTs change the level of the *DDIT3*, *ATF3*, and *DNAJB9* gene expressions in normal astrocytes more pronouncedly compared to glioblastoma cells under the influence of both smaller and bigger doses of SWCNTs. The less pronounced response of glioblastoma cells to their action may be due to the poly-resistance of tumor cells due to the endoplasmic reticulum stress present in them.

The practical significance of our results is determined by the fact that glioblastoma cells are less sensitive to the effects of graphene oxide nanoparticles and SWCNTs compared to NHA/TS, which was assessed by the level of gene expression of key transcriptional and regulatory factors. This result is a very important warning to the use of carbon nanoparticles in biomedicine without a detailed study of their possible impact on various normal cells of the body, and on the functional activity of the genome. It is worth noting that changes in the expression of key transcriptional and regulatory factors induced by graphene oxide nanoparticles and SWCNTs make it possible to detect sensitive genetic

markers of metabolic disorders, which is important for detecting health-threatening side effects.

The obtained research results indicate the importance of elucidating the molecular mechanisms of action of graphene oxide nanoparticles and carbon nanotubes when assessing the biological safety of their use for various purposes in biology and medicine since gene expression is significantly disrupted under the action of both graphene oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes significantly disrupt the expression of important genes that control the metabolism of transcriptional and regulatory factors by reprogramming the genome through endoplasmic reticulum stress. Identified disturbances in the expression of several mRNAs and microRNAs are considered as possible molecular mechanisms of the development of various pathologies and can be used to assess the toxic effects of various nanoparticles.

Keywords: carbon nanoparticles, gene expression, inhibition of ERN1, mRNA, microRNA, HBEGF, TOB1, transcription factor, ACTB, qPCR, genome, stress, endoplasmic reticulum, normal astrocytes, tumor cells.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Rudnytska O.V., Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., **Yefimova Y.V. (Kulish Y.V.)**, Sliusar M.Y., Minchenko O.H. The low doses of SWCNTs affect the expression of proliferation and apoptosis related genes in normal human astrocytes. *Curr. Res. Toxicol.* 2021, 2: 64–71. doi: 10.1016/j.crtox.2021.02.001 (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ZNF395, DJA1 та KRT18 і мікроРНК miR-7-5p, miR-10a-5p, miR-144-5p та miR-150-5p, обробка даних та участь у написанні статті*). Олена Хіта і Мирослава Слюсар допомагали у вивченні експресії *miR-10a-5p та KRT18*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Дарія Цимбал приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю до журналу. **Scopus i PubMed**

2. Minchenko O.H., Khita O.O., Rudnytska O.V., **Yefimova Y.V. (Kulish Y.V.)**, Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Sliusar M.Y., He Q., Liu K. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocr. Regul.* 2022, 56(2): 115-125. doi: 10.2478/enr-2022-0013. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p, обробка результатів та участь в оформленні публікації*). Олена Хіта і Мирослава Слюсар допомагали у вивченні експресії *miR-21-5p*. Ольга Рудницька, Дарія Цимбал та Дмитро Мінченко приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті для направлення до журналу. Q. He та K. Liu надали можливість О. Мінченку виконати дослідження з ембріонами і дозволили використати отримані препарати РНК для продовження досліджень в ІБХ. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю до друку. **Scopus i PubMed**

3. Rudnytska O.V., **Kulish YV**, Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., Viletska Y.M., Sliusar M.Y., Trufanova D.D., Minchenko O.H. Exposure

to nanographene oxide induces gene expression dysregulation in normal human astrocytes. *Endocr. Regul.* 2022, 56(3): 216-226. doi: 10.2478/enr-2022-0023. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PTGS2, P4HA1, і P4HA2, обробка даних та участь у написанні статті*). Олена Хіта і Мирослава Слюсар, а також студентка Дарія Труфанова допомагали у вивченні експресії гена *PTGS2*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Дарія Цимбал приймали участь в обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями та подав статтю для публікації у журналі. **Scopus і PubMed**

4. Minchenko D.O., Rudnytska O.V., Khita O.O., **Kulich Y.V.**, Viletska Y.M., Halkin O.V., Danilovskyi S.V., Ratushna O.O., Minchenko O.H. Expression of *DNAJB9* and some other genes is more sensitive to SWCNTs in normal human astrocytes than glioblastoma cells. *Endocr. Regul.* 2023, 57 (3): 162-172. doi:10.2478/enr-2023-0020. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів TOB1, DDX58, TFPI2 і P4HA2, обробка даних та участь у написанні статті*). Юлія Вілецька допомагали у вивченні експресії гена *P4HA2* і *TFPI2*. Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко, Олена Хіта, Олег Галкін, Сергій Даніловський і Оксана Ратушна приймали участь в обговоренні отриманих результатів та оформленні статті. Олександр Мінченко керував дослідженнями, редагував та подав статтю до журналу. **Scopus і PubMed**

5. Minchenko O.H., **Kulich Y.V.**, Viletska Y.M., Khita O.O., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Minchenko D.O. The expression of *DNAJB9* in normal human astrocytes is more sensitive to nanographene oxide than in glioblastoma cells. *Endocr. Regul.* 2024, 58(4): 242-251. <https://doi.org/10.2478/enr-2024-0029>. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів DDIT3, ATF3, ATF4, TOB1 і DNAJB9, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті*). Юлія Вілецька допомагала у вивченні експресії генів *EDEM1* і *IDH2*. Олена Хіта, Ольга Рудницька, Дмитро Мінченко та Галина Козинкевич приймали участь в

обговоренні отриманих результатів і оформленні статті до друку. Олександр Мінченко керував дослідженнями, редагував статтю та подав її до друку у журналі. **Scopus i PubMed**

6. **Єфімова Ю.В. (Куліш Ю.В.)**, Рудницька О.В., Цимбал Д.О., Мінченко О.Г. Експресія мікроРНК в ембріонах *Danio rerio* за дії одностінних вуглецевих нанотрубок. 5-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 1-2.10, 2020: 41-42.

7. Rudnytska O., **Yefimova Y. (Kulish Y.)**, Minchenko O. Single walled carbon nanotubes affect the expression of microRNA and brain development in *Danio rerio* embryos. Modern Science: Innovations and Prospects, Proc. V Int. Sci. Pract. Conf., Feb. 6-8, 2022, Stockholm, Sweden: 64-66.

8. **Yefimova Y. (Kulish Y.)**, Rudnytska O., Tsymbal D., Minchenko O. Single walled carbon nanotubes affect the expression of microRNAs and brain development in *Danio rerio* embryos. 4th RECOOP Int. Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 7-8, 2022, Prague, Czech Republic: 143.

9. Rudnytska O., **Kulish Y.**, Trufanova D., Minchenko O. Graphene oxide affect the expression of proliferation related genes. Наукова конференція молодих науковців ІБХ «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2022». Biotechnologia Acta, 2022, Vol.15, № 2, 68-69.

10. **Куліш Ю.**, Хіта О., Рудницька О., Мінченко О. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в механізмі дії наночастинок. 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 6-7.10.2022. Дніпро, вид. “Ліра” 2022: 31-32.

11. Minchenko O.H., **Kulish Y.V.**, Rudnytska O.V. Expression of DDX58 and other mRNAs is more sensitive to SWCNTs in normal human astrocytes than U87MG cells. 1st International conference “Enlight Cancer

Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 81.

12. Rudnytska O.V., **Kulish Y.V.**, Khita O.O., Viletska Y.M. The impact of graphene oxide on the expression of endoplasmic reticulum stress-dependent genes is more pronounced in normal human astrocytes than glioblastoma cells. Конференція молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2024». Biotech. acta, 2024, 17 (2): 67-69.

13. Rudnytska O.O., **Kulish Y.V.**, Viletska Y.M., Minchenko O.H. The genotoxic risks of using carbon nanoparticles in the brain tumor treatment. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, May 21-22, IMBG, Book of abstracts, Kyiv 2024: 47.

14. **Kulish Y.V.**, Rudnytska O.V., Minchenko O.H. The effect of single-walled carbon nanotubes and nanographene oxide on expression levels of TOB1, PTGS2 and HSPA5 in normal human astrocytes. International Research and Practice Conference “Nanotechnology and Nanomaterials”, 21-24 of August, 2024, Uzhhorod: 322-323.