«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. директора Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
акад. НАН України, д.б.н., проф.
Сергій КОСТЕРІН
протокол № 3 від 20.05.2025 р.

**ВИСНОВОК**

про наукову новизну, теоретичне та практичне
значення результатів дисертації
Юлії КУЛІШ

**«Вплив вуглецевих наночастинок на експресію генів транскрипційних факторів та мікроРНК»**

поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії
в галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

**1. Актуальність теми дисертаційної роботи.** Актуальність теми цієї роботи в тому, що вуглецеві наночастинки набувають широкого використання у біології та медицині для діагностики і лікування онкологічних захворювань, але проявляють як гено-токсичні, так і нейро-токсичні ефекти. А тому, з'ясування молекулярних основ розвитку їх негативних ефектів та пошук шляхів зниження токсичних впливів вуглецевих наночастинок є важливим і актуальним для покращення існуючих та створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії.

**2. Мета та завдання дисертації.** Метою роботи було дослідити вплив малих доз наночастинок оксиду графену та вуглецевих нанотрубок на експресію генів, що кодують важливі транскрипційні фактори та інші регуляторні протеїни, які пов'язані з процесами проліферації, стресом ЕР і канцерогенезом, як у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS, так і у клітинах гліобластоми U87MG, а також на експресію мікроРНК.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Дослідити вплив оксиду графену на рівень експресії генів важливих транскрипційних факторів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми.

2. Вивчити ефект оксиду графену на рівень експресії генів низки регуляторних протеїнів у нормальних астроцитах людини і клітинах гліобластоми.

3. Дослідити вплив одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії генів важливих транскрипційних факторів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми.

4. Вивчити вплив вуглецевих нанотрубок на рівень експресії генів низки регуляторних протеїнів у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми.

5. Дослідити вплив різних доз вуглецевих наночастинок на рівень експресії мікроРНК в ембріонах *Danio rerio*.

**3. Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше було встановлено, що в культурі нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS за умов дії на них дуже малих доз оксиду графену (GrO) спостерігаються виражені зміни рівня експресії важливих транскрипційних факторів та низки регуляторних протеїнів і мікроРНК. У той же час, у клітинах гліобластоми були виявлені менш виражені зміни рівня експресії важливих транскрипційних факторів та регуляторних протеїнів і мікроРНК під впливом оксиду графену. Аналогічні зміни в експресії досліджених генів спостерігалися і за дії одностінних вуглецевих нанотрубок (SWCNTs) як у нормальних астроцитах, так і у клітинах гліобластоми, причому у нормальних клітинах зміни в експресії генів були також більш вираженими. Вперше було показано, що дія наночастинок оксиду графену та вуглецевих нанотрубок на експресію різних генів переважно опосередковується стресом ендоплазматичного ретикулума, оскільки за умов пригнічення ERN1, головного сигнального шляху цього стресу, ефект як наночастинок GrO, так і SWCNTs, різко зменшувався. Отримані результати продемонстрували важливу роль ензиматичної активності ERN1 у регуляції експресії генів як важливих, стрес-залежних транскрипційних факторів (DDIT3, ATF3, ATF4, E2F1 та TP53), так і вагомих регуляторних факторів та ензимів (DNAJB9, HBEGF, TOB1, EDEM1, DDX58, P4HA2, TFPI2 і IDH2). Вперше показано, що наночастинки 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 експресії специфічної до них мікроРНК miR-182-5p, а зменшення рівня експресії мРНК *TP53* – з підвищенням miR-98-5p.

Встановлено, що тривала експозиція ембріонів *Danio rerio* за присутності одностінних вуглецевих нанотрубок порушує експресію мікроРНК miR-19a-3p, miR-21-5p і miR-96-5p, які контролюють проліферацію клітин та процеси нейрогенезу, причому це може ініціювати порушення нормального розвитку головного мозку ембріонів.

Вперше показано, що нормальні астроцити на рівні експресії генів ключових транскрипційних факторів і стрес-залежних протеїнів є більш чутливими до дії наночастинок оксиду графену та одностінних вуглецевих нанотрубок порівняно з клітинами гліобластоми. 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 зменшена чутливість клітин гліобластоми до їх дії може бути обумовлена полі-резистентністю пухлинних клітин із-за наявного у них стресу ендоплазматичного ретикулума.

4. **Теоретичне значення одержаних результатів.** Теоретичні положення, сформульовані за результатами проведених досліджень та опрацювання інших теоретичних і практичних даних, розширюють існуючі уявлення про молекулярні механізми дії наночастинок оксиду графену та вуглецевих нанотрубок на нормальні астроцити та клітин гліобластоми. Отримані результати мають важливе наукове значення, оскільки була вирішена актуальна наукова проблема щодо більш вираженого порушення експресії генів важливих транскрипційних факторів та регуляторних протеїнів у нормальних астроцитах порівняно з клітинами гліобластоми за дії на них різних вуглецевих наночастинок.

**5. Практичне значення одержаних результатів** полягає у виявленні більш високої чутливості нормальних клітин організму, а саме нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS, порівняно з пухлинними клітинами, зокрема клітинами гліобластоми лінії U87MG, до дії на них наночастинок оксиду графену та SWCNTs, яку оцінювали по рівню експресії генів транскрипційних і регуляторних факторів. Цей результат є дуже важливим застереженням до використання різних вуглецевих наночастинок у біології і медицині, у тому числі при діагностиці та лікуванні онкологічних захворювань, без детального вивчення можливого їх негативного впливу на різні нормальні клітини організму, на функціональну активність геному в них. Виявлені нами зміни рівня експресії генів низки транскрипційних факторів і регуляторних протеїнів під впливом наночастинок GrO та SWCNTs є підґрунтям для ідентифікації високочутливих генетичних маркерів метаболічних порушень, що є вкрай цінним для ранньої діагностики порушень головного мозку, які становлять серйозні ризики для здоров'я та життя пацієнтів і лікування яких пов'язане з різними побічними ефектами.

**6. Особистий внесок здобувача.** Представлена дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2021 –2025 рр. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою цієї роботи, проведено експериментальні дослідження по вивченню дії низьких доз оксиду графену та одностінних вуглецевих нанотрубок на рівень експресії генів транскрипційних факторів та важливих регуляторних протеїнів, а також експресію мікроРНК у нормальних астроцитах людини, клітинах гліобластоми та препаратах РНК із ембріонів *Danio rerio*. Особливо важливими були дослідження по виявленню більшої чутливості нормальних клітин до дії вуглецевих наночастинок порівняно з клітинами гліобластоми та можливої ролі стресу ендоплазматичного ретикулума у дії цих наночастинок на експресію генів. Авторкою здійснено статистичну обробку отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню

рівня експресії певних генів проводилися за участі інж. 1-ї кат. Мирослави СЛЮСАР, к.б.н. Юлії ВІЛЕЦЬКОЇ та доктора філософії Олени ХІТИ. Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Олександра МІНЧЕНКА.

**7. Публікації результатів роботи, їх обговорення.** Основні результати дисертації знайшли відображення у 5-ти друкованих працях, які опубліковані у періодичних наукових виданнях, віднесених до третього квартиліяв (Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Report. Аналіз внеску автора у публікації з питань, висвітлених у дисертації, показав, що внесок Юлії КУЛІШ є вирішальним, зокрема у працях:

1. Rudnytska O.V., Khita O.O., Minchenko D.O., Tsymbal D.O., **Yefimova 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).* Scopus і PubMed

2. Minchenko O.H., Khita O.O., Rudnytska O.V., **Yefimova 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).* Scopus, 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).* Scopus і PubMed

4. Minchenko D.O., Rudnytska O.V., Khita O.O., **Kulish 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*). Scopus і PubMed

5. Minchenko O.H., **Kulish 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*).

**8. Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень були представлені на міжнародних та вітчизняних конференціях: 5-та та 6-та Міжнародна наукова конференція "Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології", Дніпро, 2020 і 2022; V International scientific and practical conference "Modern Science: Innovations and Prospects", 2022, Stockholm, Sweden, 2022; 4th RECOOP International Student Conference and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conference, 2022, Prague, Czech Republic; Науковій конференції молодих науковців ІБХ "Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2022", Київ, 2022; 1st International conference "Enlight Cancer Days", Bordeaux University; Talence, France, 2023; XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, IMBG, Kyiv, 2024; Конференції молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2024», Київ, 2024; International Research and Practice Conference "Nanotechnology and Nanomaterials", Uzhhorod, 2024.

**9. Інформація щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень.** Дослідження були проведені на культурах нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS та клітин гліобластоми лінії U87MG. Культура клітин гліобластоми мозку людини лінії U87MG з вектором pcDNA3.1 та домінант-негативною конструкцією на основі цього вектора, що містила кДНК протеїну ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1) були надані професором M. Moenner (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу, Університет Бордо 1, Франція). Робота проводилася з дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки відповідно до вказівок та рекомендацій Гельсінської декларації (1975) з доповненнями від 2000 та 2008 років для роботи з використанням людського матеріалу. Це підтверджено експертним рішенням Комісії з біологічної безпеки та біоетики Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (протокол № 4, від 23 квітня 2025 р.).

Таким чином, за результатами публічної презентації Юлії КУЛІШ наукових результатів дисертації «Вплив вуглецевих наночастинок на експресію генів транскрипційних факторів та мікроРНК» та її обговорення на розширеному засіданні Випускової кафедри «Біологія» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та наукового семінару «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України ухвалили:

1. Вважати, що дисертація Юлії КУЛІШ на тему «Вплив вуглецевих наночастинок на експресію генів транскрипційних факторів та мікроРНК» є завершеною науковою працею та відповідає спеціальності 091 «Біологія».

2. Вважати, що дисертація Юлії КУЛІШ відповідає «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого постановою №261 Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року, та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи

про присудження ступеня доктора філософії» (пп. 6, 7, 8), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р.

3. Рекомендувати дисертацію Юлії КУЛІШ на тему «Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину у клітинах гліоми» до захисту на засіданні разової спеціалізованої вченої ради за спеціальністю 091 «Біологія».

02.06.2025 р.

Головуючий, заступник директора з наукової роботи
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
академік НАН України,
д.б.н., професор Сергій КОСТЕРІН

Завідувач Випускної кафедри «Біологія»
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
д.б.н., с.н.с. Лідія БАБІЧ

Секретар засідання, науковий співробітник
відділу молекулярної біології
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
д-р філ. Ольга РУДНИЦЬКА