

АНОТАЦІЯ

Манько Н.О. Вплив біологічно активних речовин у комплексах з фрагментами хітозану і похідними полівінілпіролідону на життєздатність прокаріотичних та еукаріотичних клітин. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 – Біологія). - Інститут біології клітини НАН України. - Інститут біології клітини НАН України, Львів, 2021.

Дисертація присвячена дослідженню в галузі використання полімерів та їх похідних в медицині та біотехнології.

У фармацевтиці використовують все більше медикаментів, іммобілізованих на різноманітних носіях. На роль таких носіїв претендують як природні, так і синтетичні полімери, здатні розширити можливості застосування ліків, зменшити їхню загальну токсичність, пролонгувати дію медикаментозних препаратів в організмі людини, чи прискорити детоксикацію організму. Полімери використовують не лише як каркас для приєднання різноманітних компонентів із певною біологічною активністю, наприклад, ензимів чи ліків, але й як такі, що мають власну біологічну активність.

Хітозан, що є основним похідним хітину, вважають одним із найбільш перспективних полімерів природного походження. Він є нетоксичним, біосумісним і біодеградабельним біополімером. Протягом останніх кількох років хітозан привертає особливу увагу як перспективний і відносно дешевий матеріал для широкого застосування, зокрема в медицині. Встановлено, що хітозан володіє протибактерійною, кровозупинною, хелатуючою і фунгіцидною дією.

Основним джерелом для отримання хітину з метою наступного приготування хітозану є морські безхребетні організми. Іншим джерелом хітину часто служить комахи, які можуть бути шкідниками (сарана) чи використовуються в промисловості (тутовий шовкопряд). В Україні

перспективним промисловим джерелом можуть виступати медоносні бджоли (*Apis mellifera*), а точніше весняний підмор (тіла бджіл, загиблих після зимівлі).

Важливою властивістю хітозану є позитивний заряд, що надає йому високої адгезивності і дозволяє використовувати його як носій чи біо-фільтр. Дану речовину застосовують в експериментальній біології як носій ДНК, а препарат «Celox» використовують також у військовій медицині як кровоспинний засіб. Раніше показано можливості застосування хітозану в аграрній галузі і ветеринарії, а також в екології як біо-фільтр для очищення стічних вод.

Полівінілпіролідон є синтетичним полімером, який первинно використовувався як замітник плазми крові, а зараз застосовується у фармацевтиці та косметології. Він добре розчинний у полярних розчинниках і спиртах. Полівінілпіролідон, кон'югований з біологічно активними речовинами, зменшує їхню токсичність щодо людських клітин і забезпечує стабільність і розчинність у воді.

Зважаючи на вказані аргументи, дослідження впливу згаданих природного і синтетичного полімерів є актуальним і дозволить не лише розширити спектр речовин для зв'язування з біологічно активними речовинами, зокрема медикаментозних препаратів, але й створити на їхній основі нові препарати полімерів як носіїв ліків, так і полімерів із самостійною дією.

Метою даної роботи було охарактеризувати фізико-хімічні і біологічні властивості фрагментів хітозану і його комплексів із різними біологічно активними речовинами, а також визначити вплив комплексу модифікованого полівінілпіролідону зі специфічними пептидами на мікроорганізми, нормальні та пухлинні лінії клітин ссавців.

У дисертаційній роботі розроблено оригінальну методику отримання хітозану із хітину тіл бджіл та панцирів крабів, описані умови його стерилізації та зберігання. Встановлено значну гетерогеність отримуваних зразків хітозану з різних джерел, включаючи промислові зразки.

Здійснене вивчення протимікробних властивостей хітозану відносно таких штамів мікроорганізмів як *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*. Продемонстровано високу перспективність хітозану як протигрибкового препарату, у т.ч. проти штамів *C. albicans* із мультирезистентністю до антибіотиків.

Встановлено, що зменшення молекулярної маси хітозану спричиняє підвищення його розчинності, але в той же час призводить до зниження його цитотоксичної дії на дріжджі *Candida albicans*, і, навпаки, фракції хітозану з більшою молекулярною масою володіють вищою протигрибковою активністю.

У роботі розроблено методику розчинення хітозану з використанням гліколевої кислоти, що дозволило отримувати розчинні зразки хітозану з високою молекулярною масою при нейтральному рН.

Розроблено оригінальну методику отримання хітозан-меланінового комплексу із підмору бджіл. Вивчено активність даного комплексу щодо штамів *C. albicans* ATCC 885-655, і клінічного ізоляту *C. albicans* N12, з мультирезистентністю до протигрибкових препаратів. Продемонстровано вищу активність хітозан-меланінового комплексу відносно штаму N12 з мультирезистентністю порівняно з такою активністю хітозану. Виявлено загибель дріжджових клітин *C. albicans* N12 при контакті з молекулами хітозану.

Показано низьку токсичність цього комплексу, а також хітозану щодо клітин ссавців за дози 0,2 мг/мл, у тому числі, щодо нормальних лімфоцитів периферичної крові людини, що свідчить про його біо-сумісність.

Дані результати свідчать про високу перспективність використання хітозан-меланінового комплексу для пригнічення резистентних до антибіотиків грибкових інфекцій з мінімальною шкодою для організму.

Розроблено оригінальну методику отримання хітину із плодових тіл базидіальних грибів, як ще одного перспективного джерела для отримання

хітозану в промислових масштабах. Проведене спектральне дослідження хітозану, отриманого з грибів.

Створено комплекс хітозану краба з етакридину лактатом й обґрунтовано використання хітозану як носія медикаментозних препаратів. Встановлено вивільнення етакридину лактату з його комплексу з хітозаном, що забезпечило пролонгацію перебування етакридину лактату в крові піддослідних щурів у порівнянні з вільним етакридину лактатом. Отримані результати свідчать про можливість пролонгації дії медикаментозних препаратів у кровоносному руслі за допомогою їх кон'югування з хітозаном.

Здійснено ковалентне кон'югування мономерної форми трипептиду Сер-Про-Цис з похідними полівінліпіролідону, що дозволило створити кон'югати з різною біологічною активністю. Проведено скринінгове дослідження даних кон'югатів і вибрано модифікацію з найвищою цитотоксичною активністю *in vitro* щодо злоякісних клітин ліній MCF7 і HCT116 за дози кон'югату, який складався з полімеру (1,66 мг\мл) і ковалентно зв'язаного пептиду (0,13 мг\мл).

Встановлено інгібування росту злоякісної лімфоми NK/Ly мишей пухлиноносіїв лінії C57/Black за кумулятивної дози 30 мг/кг протягом введення кон'югату *in vivo*. Разом з тим, дана комплексна сполука має відносно малу токсичність щодо псевдонормальних клітин лінії HEK293 ембріона нирки людини й активованих нормальних лімфоцитів периферичної крові людини.

Встановлено, кон'югат P4P із флуоресцентною міткою FITC у діапазоні 2-6 год проникає в клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини і накопичується у везикулах клітин, але не потрапляє в їхнє ядро.

Доведено утворення активних форм кисню (за допомогою барвника DCFDA, що виявляє пероксид водню) за дії комплексу P4P на клітини лінії MCF7 карциноми молочної залози людини.

Розроблено оригінальний підхід для отримання білків-мішеней дії різних чинників з використанням магнітних частинок. За допомогою MALDI-TOFF мас-спектрометрії вперше ідентифіковано внутрішньоклітинні білки, які взаємодіють з комплексом P4P в клітинах мишачої лімфоми NK/Ly і можуть

слугувати його молекулярними мішенями. Серед ідентифікованих білків знаходяться структурні білки клітин (актин, кератин цитоскелету, цитоплазматичний бета-актин, міозин) і сироватковий альбумін.

Результати проведеного дослідження комплексу Р4Р підтверджують перспективність застосування модифікованих похідних полівінілпіролідону для ковалентного кон'югування з молекулами біологічного генезу для створення нових медикаментозних препаратів. Важливим наслідком таких модифікацій є підвищення біологічної активності створеного кон'югату.

У дисертаційній роботі пояснені причини неоднозначних результатів, отриманих у різних лабораторіях під час тестування біологічної активності хітозану різного походження. Це розширює медичні, біотехнологічні та фармакологічні можливості застосування даного полімера і його похідних як носія та самостійного препарату. Розроблені оригінальні методики отримання хітозану дозволяють запропонувати його похідні у промислове виробництво на території України. Для цього можна використати місцеву сировину для виготовлення кровоспинних і протигрибкових препаратів.

Всі дослідження, представлені у дисертаційній роботі, було виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведений аналіз наукової літератури, виконана основна частина експериментальної роботи і статистична обробка даних. Планування роботи, аналіз та обговорення отриманого матеріалу, приготування рукописів статей проводилося з науковим керівником член-кор. НАН України, Стойкою Р. С. та науковими консультантами д.б.н., проф. Луциком М.Д, д.б.н., Котом Ю.Я, д. фарм. н., проф. Антонюком О.В.

Мас-спектрометрію білків проводили під керівництвом проф. Сергія Сушельницького в Національному Катарському Університеті (м. Доха, Катар) в рамках гранту Фольксваген (Німеччина). Мікроорганізми для дослідження протимікробної активності були отримані від кафедри генетики та біотехнології Університету імені Івана Франка

Ключові слова: хітозан, полімер, комплекс, полівінлпіролідон, дріжджі, *Candida albicans*, токсичність, білки мішені, лінії клітин пухлин.

SUMMARY

Manko N.O. The influence of biologically active substances in complexes with fragments of chitosan derivatives and polyvinylpyrrolidone on the viability of prokaryotic and eukaryotic cells. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 - Biology). Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine. - Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2021.

This research focuses on the use of polymers and their derivatives in medicine and biotechnology.

In the pharmaceutical industry uses more drugs immobilized on various carriers. The role of such carriers is claimed by both natural and synthetic polymers that can expand the possibilities of drug use, reduce their overall toxicity, prolong the action of drugs in the human body, or accelerate the detoxification of the body. Polymers are used not only as a framework for attaching various components with a certain biological activity, such as enzymes or drugs, but also as having their own biological activity.

Chitosan, which is the main derivative of chitin, is considered one of the most promising polymers of natural origin. It is a non-toxic, biocompatible and biodegradable biopolymer. Over the past few years, chitosan has attracted special attention as a promising and relatively cheap material for widespread use, particularly in medicine. It is established that chitosan has antibacterial, hemostatic, chelating and fungicidal action.

The main source for the production of chitin for the subsequent preparation of chitosan are marine invertebrates. Another source of chitin is often insects, which can be pests (locusts) or used in industry (mulberry silkworm). In Ukraine, a promising

industrial source may be honey bees (*Apis mellifera*), or rather the spring plague (the bodies of bees that died after winter).

An important property of chitosan is a positive charge, which gives it high adhesion and allows it to be used as a carrier or bio-filter. This substance is used in experimental biology as a DNA carrier, and the drug "Celox" is also used in military medicine as a hemostatic agent. Previously, the possibilities of using chitosan in agriculture and veterinary medicine, as well as in ecology as a bio-filter for wastewater treatment.

Polyvinylpyrrolidone is a synthetic polymer that was originally used as a substitute for blood plasma and is now used in pharmaceuticals and cosmetology. It is well soluble in polar solvents and alcohols. Polyvinylpyrrolidone, conjugated to biologically active substances, reduces their toxicity to human cells and provides stability and solubility in water.

In view of these arguments, the study said the impact of natural and synthetic polymers are relevant and will not only expand the range of materials for binding biologically active substances, including medicinal drugs, but also to create on their basis of new drugs polymers as carriers of drugs and polymers with independent action.

The aim of this study was to characterize the physicochemical and biological properties of chitosan fragments and its complexes with various biologically active substances, as well as to determine the effect of a complex of modified polyvinylpyrrolidone with specific peptides on microorganisms, normal and tumor mammalian cell lines.

In the dissertation work the original method of obtaining chitosan from chitin of bee bodies and crabs' shells is developed, the conditions of its sterilization and storage are described. Significant heterogeneity of the obtained samples of chitosan from different sources, including industrial samples, was established.

Realized study the antimicrobial properties of chitosan against such strains as *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*. The high promise of chitosan as an antifungal drug, including against strains of *C. albicans* with multidrug resistance.

Decrease molecular weight chitosan causes increase its solubility, but at the same time it reduces the cytotoxic effects on yeast *Candida albicans*, and, conversely, chitosan fractions with higher molecular weight have higher antifungal activity.

The method of dissolving chitosan using glycolic acid was developed in the work, which allowed to obtain soluble samples of chitosan with high molecular weight at neutral pH.

An original method of obtaining a chitosan-melanin complex from bee stings has been developed. The activity of this complex against strains of *C. albicans* ATCC 885-655, and clinical isolate of *C. albicans* N12, with multidrug resistance to antifungal drugs was studied. The higher activity of the chitosan-melanin complex against strain N12 with multidrug resistance was demonstrated compared to that of chitosan. The death of yeast cells of *C. albicans* N12 upon contact with chitosan molecules was detected.

The low toxicity of this complex, as well as chitosan against mammalian cells at a dose of 0.2 mg / ml, including against normal human peripheral blood lymphocytes, has been shown, indicating its biocompatibility.

These results indicate the high prospects for the use of chitosan-melanin complex to suppress antibiotic-resistant fungal infections with minimal harm to the body.

An original method for obtaining chitin from the fruiting bodies of basidiomycetes has been developed as another promising source for obtaining chitosan on an industrial scale. A spectral study of chitosan derived from fungi was performed.

A complex of chitosan crab with ethacridine lactate was created and the use of chitosan as a carrier of drugs was substantiated. The release of ethacridine lactate from its complex with chitosan was established, which ensured the prolongation of

ethacridine lactate in the blood of experimental rats in comparison with free ethacridine lactate. The results indicate the possibility of prolonging the action of drugs in the bloodstream by conjugating them with chitosan.

Covalent conjugation of the monomeric form of the tripeptide Ser-Pro-Cis with polyvinylpyrrolidone derivatives was performed, which allowed to create conjugates with different biological activity. A screening study of these conjugates and selected the modification with the highest cytotoxic activity *in vitro* against malignant cells of the MCF7 and HCT116 lines at a dose of conjugate consisting of polymer (1.66 mg/ml) and covalently bound peptide (0, 13 mg/ml).

Inhibition of NK/Ly malignant lymphoma growth was observed in tumor-bearing mice of the C57/Black line at a cumulative dose of 30 mg/kg during *in vivo* administration of the conjugate. However, this complex compound has relatively low toxicity to pseudonormal cells of the HEK293 line of the human kidney embryo and activated normal human peripheral blood lymphocytes.

It was found that the P4P conjugate with a FITC fluorescent label in the range of 2-6 h penetrates the cells of the MCF7 line of human breast cancer and accumulates in the vesicles of cells, but does not enter their nucleus.

An original approach has been developed to obtain target proteins of various factors using magnetic particles. Using MALDI-TOFF mass spectrometry was first identified intracellular proteins that interact with the complex P4P cells in mouse lymphoma NK / Ly and it can serve as molecular targets. Among the identified proteins are structural proteins of cells (actin, cytoskeleton keratin, cytoplasmic beta-actin, myosin) and serum albumin.

The results of the study of the P4P complex confirm the prospects of using modified polyvinylpyrrolidone derivatives for covalent conjugation with molecules of biological genesis to create new drugs. An important consequence of such modifications is an increase in the biological activity of the resulting conjugate.

The dissertation explains the reasons for the ambiguous results obtained in different laboratories during testing of the biological activity of chitosan of different

origin. This expands the medical, biotechnological and pharmacological possibilities of using this polymer and its derivatives as a carrier and a stand-alone drug. Developed original methods of obtaining chitosan allow to offer its derivatives in industrial production in Ukraine. You can use local raw materials for the manufacture of hemostatic and antifungal drugs.

All studies presented in the dissertation were performed in person or with the direct participation of the applicant. The author of the dissertation independently analyzed the scientific literature, performed the main part of the experimental work and statistical data processing. Work planning, analysis and discussion of the received material, preparation of manuscripts of articles was carried out with the supervisor of the corresponding member. NAS of Ukraine, Stoika RS and scientific consultants Dr., prof. Lootsik MD, Dr., Kit Yu.Ya., Dr., prof. Antonyuk OV.

Mass spectrometry of proteins was performed under the guidance of prof. Serhiy Sushelnytsky at the National University of Qatar (Doha, Qatar) under a grant from Volkswagen (Germany). Microorganisms for the study of antimicrobial activity were obtained from the Department of Genetics and Biotechnology, Ivan Franko University

Key words: chitosan, polymer, complex, polyvinylpyrrolidone, yeast, *Candida albicans*, toxicity, target proteins, tumor cell lines.

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації

1. Manko N, Starykovych M, Bobak Y, Stoika R, Richter V, Koval O, Lavrik I, Horák D, Souchelnytskyi S, Kit Y. / The purification and identification of human blood serum proteins with affinity to the antitumor active RL2 lactaptin using magnetic microparticles. // Biomed Chromatogr. – 2019 Vol.33 P.46-47.
2. [Paiuk O](#), [Mitina N](#), [Slouf M](#), [Pavlova E](#), [Finiuk N](#), [Kinash N](#), [Karkhut A](#), [Manko N](#), [Gromovoy T](#), [Hevus O](#), [Shermolovich Y](#) [Stoika R](#), [Zaichenko A](#) / Fluorine-containing block/branched polyamphiphiles forming bioinspired

complexes with biopolymers. // [Colloids Surf B Biointerfaces](#). – 2019. Vol.174. P.393-400.

3. Antonyuk V.O., Panchak L.V., Manko N.O., Stoika R.S. / Chitosan of peppery milky cap fungi (*Lactarius pergamenus* (Fr.) Fr): isolation, study of its physicochemical properties and biological activity // *Revista de chimie* – 2020. Vol.71.
4. M. Lootsik, N. Manko, O. Gromyko, S. Tistechok, M. Lutsyk (jr.) ,R. Stoika / Honey bee chitosan-melanin complex: Isolation and investigation of its antimicrobial activity. // *Ukr. Biochem. J.* – [2020. Vol. 92. P.143-153](#)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Lootsik M. Antifungal activity of honeybee chitosan-melanin complex and its fragment / M. Lootsik, N. Manko, R. Stoika // *Bridges 14th Annual Scientific*, Bratislava, Slovak Republic, April 10-14, 2019: Book of abstracts. – Bratislava, 2019. – P. 140.
2. Manko N. Isolation of honeybee chitosan-melanin fragments and their effects on the viability of bacterial, fungi, and mammalian cells in vitro / N. Manko, M. Lootsik, S. Tistechok, O.Gromyko, R. Stoika // *RECOOP 10th Annual Project Review Meeting*, October 11-12, 2019 : Book of abstracts. – Wroclaw, 2019. – P. 80
3. Manko N. Effect of honeybee chitosan-melanin fragments upon viability in vitro of bacterial, fungi, and mammalian cells / N. Manko, M. Lootsik, S. Tistechok, O. Gromyko, R. Stoika // *6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation*, Yaremche, Ukraine, 18-21 June 2019: Book of abstracts. – Yaremche, 2019. – P. 40
4. Manko N. Biological activity of Ser-Pro-Cys peptide and its conjugates with synthetic functional polymers / N. Manko, M. Starykovych, O. Zaichenko, N. Mitina, O. Paiuk, R. Stoika, Y. Kit // *XII Український біохімічний конгрес*, Тернопіль Україна, 30 вересня – 04 жовтня 2019 р., *Медична та клінічна хімія*. Т. 21, № 3 (додаток) : Збірник тез. – Тернопіль, 2019. – С

5. Kit Yu. Biological activity of Ser-Pro-Cys peptide and its nanoconjugates with synthetic polymers / Yu. Kit, N. Manko, A. Zaichenko, N. Mitina, O. Paiuk, M. Starykovich, R. Stoika. // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. Bratislava, Slovak Republic, October 11-14, 2018. Bratislava, 2018. P. 38
6. Manko N. Biological activity of human blood serum peptide Prosercin and its synthetic analog Ser-Pro-Cys: N. Manko comparative analysis / N. Manko, M. Starykovich, S. Myronovsky, T. Negruch, N. Negruch, M. Shorobura, V. Richter, R. Panchuk, R. Stoika, Yu. Kit. // RECOOP 9th Annual Project Review Meeting. Bratislava, Slovak Republic, October 11-14, 2018. Bratislava, 2018. P. 70
7. Lootsik M. Antimicrobial activity of honeybee chitosan-melanin complex and its hydrolytic fragments / M. Lootsik, N. Manko, M. Lutsyk (Jr.), R. Stoika. // International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology” Lviv. Ukraine, October 29-31, 2018. Lviv, 2018. – P.24
8. Lootsik M. Studies on the antibacterial activity of honeybee chitosan and its derivatives / M. Lootsik, N. Manko, A. Karmash, R. Stoika // 7th International Weigl Conference. September 26-29, 2017. Lviv, Ukraine. Abstracts Book. – 2017. – P. 46.