

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Черній Світлани Вікторівни “Дослідження фталоціанінових комплексів з аксіально-координованими замісниками як інгібіторів амілоїдної агрегації білків”, що подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

З’ясування молекулярних механізмів формування білкової структури, причин, молекулярних механізмів та функціональних наслідків її порушення належить до провідних напрямків досліджень сучасної біохімії та молекулярної біології. Серед цих досліджень протягом останніх десятиріччь дедалі більшої уваги набувають дослідження шляхів утворення  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів, що як *in vivo*, так і *in vitro* відіграють роль потужного промоутера, що порушує перебіг безлічі фізіологічних процесів. Утворення подібного роду структур становить невід’ємну обставину перебігу багатьох нейродегенеративних захворювань, амілоїдозів та утворення цілої низки аномальних тканин, у той чи інший спосіб пов’язаних з порушенням нормального білкового обміну. Споконвічна проблема молекулярної біології – формування тілець включення при отриманні рекомбінантних білків – також обумовлена не лише неефективністю шаперенових системи клітини-продуцента до еволюційно чужорідного білка, але й закономірностями процесу  $\beta$ -агрегації неструктурованих білків. Це не лише ускладнює біотехнологічні технології, але й обумовлює фактори ризику при вжитку харчових продуктів трансгенного походження. Агрегація білкових препаратів медикаментозного призначення може бути причиною розвитку аутоімунних процесів, що істотно ускладнює, якщо не зводить нанівець, дію відповідних лікарських засобів. Саме  $\beta$ -структуровані білкові фібрили становлять “будівельні ліса” позаклітинної полімерної речовини біоплівки, забезпечуючи тим самим різке зростання опірності мікроорганізмів до дії антибактеріальних препаратів. Отже, механізми утворення  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів та виявлення механізмів можливого впливу на цей процес становить задачу, актуальну як з науково-пізнавальної, так і з практичної точок зору. Тому ні до теми

розглянутої роботи, ні до її мети - розробки інгібіторів амілоїдної агрегації білків на основі макроциклічних металокомплексів об'ємної та планарної геометрії та вивчення їх взаємодії з мономерними та агрегованими білками – жодних заперечень немає. Відповідно до поставленої мети сформульовано низку практичних завдань, присвячених оцінці інгібіторної дії макроциклічних комплексів різної геометрії на процес фібрилоутворення білків, порівняти вплив складу та структури досліджуваних металокомплексів на структуру продуктів агрегації амілоїдогенних білків - лізоциму та інсуліну. Як відомо, саме наслідки агрегаційних процесів, що аутохтонно відбуваються в препаратах останнього, зумовили інтенсивні дослідження процесів самоушкодження білкових препаратів. Належної уваги приділено й оцінці схильності досліджуваних сполук до самоасоціації, з'ясування залежності між здатністю до неї та впливом на процес фібрилоутворення білка. Все це супроводжувалось дослідженням спектральних властивостей сполук у вільному стані, за присутності мономерного та агрегованого білка, з'ясуванням можливості використання підсиленої металом флуоресценції для підвищення чутливості зондів. Подібна деталізація роботи видається виправданою і заперечень не викликає. Варто підкреслити обгрунтованість вибору досліджуваних потенційних інгібіторів амілоїдоутворення та застосування при виконанні роботи найсучасніших біохімічних та біофізичних методів. В даному випадку застосовано флуоресцентну спектроскопію, електронну спектроскопію поглинання, атомно-силову та скануючу електронну мікроскопію, спектроскопію динамічного розсіяння світла та поверхнево підсилену раманівську спектроскопію. Один лише перелік застосованих методів свідчить про виконання роботи на дуже високому методичному рівні. Варто зазначити й таку істотну рису роботи, як виконання її частини у співпраці з вітчизняними та закордонними дослідницькими центрами.

Дисертація викладена на 156 сторінках та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, трьох розділів, де наведено експериментальні здобутки роботи та їх обговорення, висновків, списку

цитованої літератури, що містить 165 джерел та додатків, що містять перелік наукових публікацій здобувача, структури досліджуваних сполук та спектри електронного поглинання. Подібна компоновка є традиційною і заперечень не викликає. Вступна частина повною мірою відповідає своїй задачі і належно висвітлює проблематику роботи. Як впливає з оглядової частини, автор належним чином ознайомилась з найновітнішими науковими даними з розглянутої проблеми. Методична частина також повною мірою відповідає поставленій меті роботи. В трьох розділах, що містять отримані результати та їх обговорення розглянуто дані спектральних досліджень впливу на процес фібрилоутворення модельних амілоїдогенних білків інсуліну та лізоциму фталоціанінів гафнію та цирконію з аксіально-координованими замісниками, фталоціанінів і порфіразинів, охарактеризовано продукти реакції амілоїдної агрегації методами атомно-силової, скануючої електронної мікроскопії та динамічного розсіяння світла, наведено результати досліджень взаємодії фталоціанінів з сформованими амілоїдними фібрилами. На підставі отриманих даних обґрунтовано припущення щодо механізму інгібування процесу фібрилоутворення макроциклічних комплексів.

Внаслідок проведеного дослідження отримано результати, що становлять безсумнівний науковий та практичний інтерес. Вперше вивчено інгібуючу активність серії фталоціанінів та порфіразинів різної геометрії на процес фібрилоутворення білків. Виявлено вискоєфективні інгібітори амілоїдної агрегації білків, показано вплив структури досліджуваних сполук на процес агрегації та тип утворюваних агрегатів. Показано кореляцію здатності фталоціанінових комплексів до самоасоціації з їх інгібуючим впливом на процес фібрилоутворення. Вперше показано можливість використання фталоціанінів для визначення амілоїдних фібрил методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Проаналізовано вплив структури, природи центрального металу та геометрії замісників макроциклічних комплексів на їх здатність до пригнічення фібрилоутворення та визначено

найефективніші інгібітори цього процесу серед сполук досліджуваної групи. Це, в свою чергу, створює передумови для дизайну антифібрилогенних агентів.

Знову ж таки маю зазначити, що роботу виконано на високому методичному рівні, дотримані результати подані коректно, їх обговорення проведено на високому професійному рівні, а зроблені на їх підставі висновки повною мірою відповідають отриманим результатам і заперечень не викликають. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 6 статей у наукових фахових журналах, їх неодноразово доповідали на вітчизняних та наукових з'їздах та конференціях.

Принципових зауважень до роботи немає. Щоправда, як на мою думку, лишилися без належного висвітлення щонайменше дві риси розглянутої роботи. Формування  $\beta$ -структурованої фібрили відбувається в щонайменше дві, якісно відмінні між собою, стадії – утворення зародка фібрили (нуклеусу) та лінійне чи тривимірне розростання фібрили. Як впливає з матеріалів розглянутої роботи, перша стадія відбувається значно повільніше за другу, фібрили мало схильні до асоціації між собою, а застосовані речовини-інгібітори агрегації здатні ефективно пригнічувати саме другу стадію процесу. Тобто досліджувані автором сполуки або створені за їх структурними принципами аналоги можуть мати істотне практичне значення для пригнічення агрегації білкових препаратів медичного призначення і, як наслідок, зниження їх імуногенності, обумовленої ад'ювантними ефектами стабілізації денатурованих форм білків у складі препарату. Гальмування агрегаційного процесу на стадії формування нуклеусу не лише зменшує кількість денатурованого білка, але й лишає його в легкій для вилучення клітинними компонентами імунної системи формі. На цьому варто було б зробити наголос, оскільки практичне значення виявлених автором ефектів явно варте більшої уваги. З тих же міркувань заслуговує обговорення й можливості застосованого автором комплексу методів для виявлення нанорозмірних  $\beta$ -структурованих білкових агрегатів в продуктах харчування на основі трансгенних рослин. Висока стійкість до протеолізу, імуногенність, здатність допроходження через біологічні бар'єри

та накопичення в клітинних мембранах перетворює супрамолекулярні білкові асоціати на потужний фактор порушення перебігу різноманітних фізіологічних процесів. Цей бік питання також видається вартим уваги. Також хотілось би почути думку автора щодо наступних питань:

1. Загальновизнаним амілоїдчутливим барвником для детекції фібрил є Тіофлавін Т. У роботі використовувався ціаніновий барвник 7519. Чим обґрунтовано використання саме цього барвника? Які його переваги перед Тіофлавіном Т?
2. У роботі виявлено здатність фталоціанінових комплексів переспрямовувати реакцію фібрилоутворення у бік формування різних типів агрегатів, зокрема олігомерів та аморфних структур. Згідно літературних даних, олігомерні агрегати ряду білків є токсичними. Чи проводилася характеристика олігомерних агрегатів?
3. У роботі досліджено можливість визначення амілоїдних фібрил інсуліну фталоціаніном методом поверхнево підсиленої раманівської спектроскопії. Чому не порівнювали поверхнево підсилені раманівські спектри цього фталоціаніну у присутності нативного інсуліну? Чи спостерігається подібний ефект, як у випадку амілоїдних фібрил?
4. У роботі показано руйнування самоасоціатів фталоціаніну у присутності амілоїдних фібрил, але подібного ефекту у присутності нативного інсуліну не спостерігається. В чому різниця у взаємодії фталоціаніну з нативним білком та з амілоїдними фібрилами?

Варто зазначити, що роботі притаманні дрібні недоліки оформлення. Є невдалі вислови, граматичні та синтаксичні помилки, англіцизми. Не на всіх зображеннях, отриманих методом атомно-силової мікроскопії, мають осі масштабу. Однакове оформлення рисунків полегшило би сприйняття даних.

Як видно, наведені запитання та зауваження мають радше дискусійний характер і не впливають на високу оцінку роботи в цілому. Поставлені завдання успішно виконано, а сама робота являє собою виконане на високому науково-методичному рівні завершене дослідження. Тому вважаю, що за актуальністю,

обсягом і змістом проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів дисертаційна робота Черній Світлани Вікторівни “Дослідження фталоціанінових комплексів з аксіально-координуваними замісниками як інгібіторів амілоїдної агрегації білків” є цілісною, закінченою науковою працею та повною мірою відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент – завідувач лабораторії біохімії  
ДУ “Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України”,  
доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Вервочка С.В.

Підпис *Вервочка С.В.*  
ЗАСВІДЧУЮ  
Зав. відділом кадрів *Григорук А.А.*

