

## ВІДГУК

Офіційного опонента на дисертаційну роботу **Куперман Марини Володимирівни „Вивчення взаємодій між глобулярними білками і борвмісними каркасними макроциклічними комплексами”**, представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

На даний час відома надзвичайно велика кількість бор-органічних сполук, тобто таких, що містять зв'язок бор-вуглець. Їх будова та властивості досить добре досліджені. Значно менше досліджені сполуки бору які є “неорганічними” аналогами органічних сполук. До них відносяться гідриди бору, карборани, азаборани, клозо-борати та деякі інші класи борвмісних сполук. Так боранам притаманне утворення гомологів подібно алканам, боразол є неорганічною циклічною ароматичною сполукою ізоструктурною бензолу, карборани та клозо-борати – тривимірні каркасні кластерні сполуки, їх можна вважати елементорганічними аналогами фулеренів. Більшість з цих класів сполук, зокрема, клозо-борати вступають в реакції притаманні для органічних речовин, таких як нуклеофільне та електрофільне заміщення, перегрупування та рециклізація тощо.

Клатрохелати є представниками тривимірних макрополіциклічних комплексів з інкапсульованим іоном металу. Їх існування не можливе без так званих зшиваючих апікальних груп. Як правило, такими групами виступають різноманітні борвмісні фрагменти. Ці фрагменти, а також ребра клатрохелатів можна модифікувати різноманітними замісниками.

Таким чином, зовсім не подібні між собою клозо-борати та клатрохелати мають багато спільних рис. Вони є високостабільними квазіароматичними тривимірними сполуками; їм притаманна висока симетрія базових макроциклів; вони можуть нести позитивний, негативний заряд або бути електронейтральними; їх досить легко модифікувати різноманітними замісниками змінюючи їх фізико-хімічні, гідрофільно-ліпофільні властивості, симетрію, і як наслідок дипольний момент. Все це дає можливість змінювати їх властивості у дуже широких межах, а тривимірна структура дозволяє припустити їх використання для створення так званих топологічних лікарських засобів.

Біологічні властивості цих сполук, особливо клатрохелатів, досліджені недостатньо, тому тема дисертаційного дослідження „Вивчення взаємодій між глобулярними білками і борвмісними каркасними макроциклічними комплексами”, яку обрала Куперман М.В, є цілком актуальною та логічною.

Роботу виконано у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України у рамках бюджетної тематики Інституту «Раціональний дизайн інгібіторів протеїнази як попередників лікарських засобів» (№ держ. реєстрації 0112U004110, 2012-2017 р.) та низки міжнародних грантів: гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» Дослідна і інноваційна програма Марії Складовської-Кюрі (грант № 778245), та грантів Європейської федерації біохімічних товариств (FEBS) у 2016 та 2018 роках.

Дисертація являє собою завершене наукове дослідження, її **актуальність, мета та завдання дослідження, наукове і практичне значення одержаних результатів** логічно пов'язані між собою та розкриті у вступі, основній частині, що містить огляд літератури, експериментальну частину, три розділи обговорення результатів, висновки, додатки та список використаних джерел (245 найменувань). Роботу викладено на 161 сторінці друкованого тексту, вона містить 38 рисунків, 9 таблиць та 6 додатків.

**Перший розділ** – огляд літератури – виконано на високому рівні. Він охоплює літературу до 2019 року включно. У ньому розглянуто супрамолекулярні взаємодії білок-ліганд, відомості про каркасні борвмісні сполуки – клозо-борати та клатрохелати (просторова будова, хімічні, біологічні властивості) та розглянуто властивості глобулярних білків (включаючи механізми їх агрегації). Також у розділі наведено сучасні методи дослідження, які використовуються для аналізу взаємодій білок-ліганд. Наведені у літературному огляді відомості в подальшому використовувались у роботі.

У наступних розділах роботи представлено результати власних досліджень здобувача. Результати досліджень змістовні та логічно викладені. У **другому розділі** наведено перелік використаних у роботі матеріалів, методів дослідження та математичних розрахунків. Детально наведено методики приготування стокових та робочих розчинів білків та барвників, отримання фібрилярних білків, та дослідження взаємодій білок – ліганд методами КД, ЕСП, флуоресцентної спектроскопії, ІТК, ТЕМ тощо.

В **третьому розділі** наведено результати дослідження взаємодій глобулярних білків з біологічно активними борвмісними каркасними макроциклічними сполуками - клозо-боратами. Ці взаємодії вивчались флуоресцентними методами аналізу та за допомогою КД спектроскопії. За допомогою ІКТ було отримано термодинамічні параметри зв'язування та запропоновано модель множинного зв'язування клозо-боратів у двох типах сайтів БСА з близькими енергетичними параметрами. Також встановлено, що у таких

взаємодіях відіграє роль як структура кластеру так і природа його замісників: найвищу спорідненість до альбумінів продемонстрували галоген заміщені клозо-борати. Зроблено висновок про перспективність їх використання, як потенційних агентів для БНЗТ.

**Четвертий розділ** є логічним продовженням третього. У ньому досліджено реакцію фібрилізації білку під дією дианіонного гідроген клозо-додекаборату за допомогою КД, ТЕМ та флуоресцентних методів. Встановлено, що в залежності від концентрації клозоборату відбуваються різні конформаційні зміни білку, що приводить до змін у морфології фібрил. Також були розроблені ціанінові та стирилціанінові флуоресцентні барвники для їх використання як зондів для моніторингу і детекції агрегації білків та визначення нуклеїнових кислот у присутності білків і їх агрегатів. Запропоновано використання цих барвників як фотостабільних та недорогих флуоресцентних зондів для рутинних лабораторних експериментів.

**П'ятий розділ** присвячено вивченню взаємодій білків з клатрохелатами заліза. Для цього використовувались КД, флуоресцентні методи, ІКТ, а також комп'ютерне моделювання. Самим важливим результатом цієї частини роботи вважаю відкриття наведеної хіральності у оптично неактивних клатрохелатах при взаємодії з білком. Встановлено, що важливу роль у цьому ефекті відіграє природа реберних замісників у молекулі клатрохелату – найбільш інтенсивні ІКД сигнали спостерігались у випадку клатрохелатів з двома або шістьма карбоксильними групами. Отримано їх константи зв'язування з БСА та зроблено припущення щодо механізму зв'язування клатрохелатів з альбумінами.

Відповідно встановленим вимогам, основні результати дисертаційної роботи опубліковано в 7 статтях у наукових фахових виданнях (всі роботи індексуються наукометричними базами даних WoS та Scopus) та 10 тезах доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях, вони повністю відображають основний зміст дисертаційної роботи. Оцінюючи результати роботи представлені автором, можу сказати що робота, присвячена **вирішенню проблеми** здатності утворення супрамолекулярних зв'язків між рядом глобулярних білків і біоактивними борвмісними макроциклічними каркасними сполуками, виконана на фундаментальному рівні, вона безумовно містить **наукову новизну**. Найбільш суттєві аспекти наступні: досліджено взаємодії глобулярних білків з незаміщеними і функціоналізованими клозо-боратами та клатрохелатами заліза. Для обох систем встановлено можливість утворення комплексів з сироватковими альбумінами. Охарактеризовано параметри цих

комплексів, зокрема, константи зв'язування та стехіометрію комплексів. Визначено, що аніонні клозо-борати здатні впливати на реакцію фібрилоутворення інсуліну – пришвидшувати денатурацію інсуліну та змінювати морфологію фібрил, що утворюються. Вперше показано, що клатрохелати заліза є ефективними КД-репортерами, що здатні відчувати зміни конформації білків та спектрально розрізняти родинно близькі білки. В аспекті **прикладного значення** роботи варто відзначити встановлення ролі функціональних замісників в клозо-боратах на ефективність їх зв'язування з альбумінами, що може бути використано для створення нових препаратів для БНЗТ. Клатрохелати заліза було запропоновано як КД-репортери чутливі до структурних елементів білкової поверхні. Запропоновано ряд нових триметинціанінових барвників для моніторингу кінетики фібрилоутворення білків.

**Разом з тим, до дисертаційної роботи виникли певні зауваження та питання**

1. На стор. 72-73 визначається механізм гасіння флуоресценції при взаємодії білків з кластерами бору, та повідомлено про неможливість динамічного механізму гасіння флуоресценції. Натомість, автор вважає, що гасіння флуоресценції білків є результатом зв'язування клозо-боратів з білками. Незрозуміло, яким чином автор прийшов до такого висновку.

2. На стор. 79 зроблено припущення, що взаємодія клозо-боратів з альбумінами відбувається у домені ІІА сайту І біля триптофанових залишків. При цьому кількість кластерів галогенклозо-боратів, що зв'язуються може досягати 4-5, а гідроген клозо-борату лише 2 аніони на білок. Як це можливо з точки зору стеричних параметрів?

3. У четвертому розділі запропоновано нові ціанінові та стирилціанінові флуоресцентні барвники для моніторингу процесів агрегації білків. Чому вони не використовувались у роботі (стор.85-88)?

4. КД спектри були отримані при молярному співвідношенні білку до клатрохелату 2 до 1 (стор. 108), що виглядає досить дивно – половина білку не приймає участі у взаємодії. Та чому падає інтенсивність КД сигналу при збільшенні концентрації клатрохелату до 4 на одну молекулу білку.

5. КД відгук з альбумінами дають клатрохелати, що містять карбоксифенільні групи. Чи відомі інші функціональні групи в клатрохелатах які дають подібний ефект?

6. Робота містить незначну кількість граматичних помилок та стилістичних неточностей. Наприклад, на рис. 3.4 (стор. 76) невірно вказані легенди у підписах; замісники у клатрохелатах у деяких випадках названо карбоксифенільними, у інших карбоксильними (стор. 102), а інколи просто “гекса- клатрохелатними ізомерами” (стор. 112) тощо. Також не варто використовувати терміни комплекс та металокомплекс у сенсі координаційної хімії, оскільки в молекулярній біології вони мають інше значення.

Зазначені недоліки та зауваження не знижують високу наукову значимість результатів, отриманих дисертантом. Роботу виконано на високому експериментальному та теоретичному рівні; постановку експериментів та обробку одержаних результатів проведено коректно. Об’єктивність і достовірність наукових положень та висновків визначаються застосуванням сучасних фізико-хімічних методів досліджень: ЕСП, КД, флуоресцентної спектроскопії, ІКТ, ТЕМ, гель-електрофорезу, проточної цитометрії, відповідністю та адекватністю результатів незалежних вимірювань. Наведені висновки переконливі. Дисертація добре оформлена, містить значну кількість ілюстрацій, що значно спрощує сприйняття викладеного матеріалу. Все це свідчить про високу професійну кваліфікацію здобувача. Загальний h-індекс Куперман М.В. за даними наукометричної бази даних Scopus дорівнює семи.

Зміст автореферату повністю відображає основні положення дисертації. Він містить усі необхідні пункти стислого опису дисертації та результатів дослідження. Загальна характеристика роботи та висновки в дисертації та авторефераті є ідентичними. В цілому автореферат відповідає вимогам, що висуваються ДАК Міністерства освіти і науки України до кандидатських дисертацій.

На основі викладеного вище вважаю, що кваліфікаційна робота „Вивчення взаємодій між глобулярними білками і борвмісними каркасними макроциклічними комплексами” являє собою завершене дослідження, у якому отримано нові науково обґрунтовані результати, що вирішують конкретну наукову проблему в галузі сучасної молекулярної біології – взаємодії глобулярних білків, зокрема, альбумінів з біоактивними борвмісними макроциклічними каркасними сполуками, та вивченню ролі функціональних замісників цих каркасних сполук в таких взаємодіях.

Дисертаційна робота за актуальністю обраної теми, науковою новизною, обсягом, достовірністю та рівнем апробації отриманих результатів, обсягом

експериментального матеріалу, глибиною його осмислення і обговорення, обґрунтованістю висновків і якістю оформлення відповідає п.п. 9, 11, 12 і 13 «Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 та паспорту спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія. Кількість та якість наукових праць Куперман М.В., опублікованих за результатами дисертаційної роботи, відповідає Наказу №1112 МОН України від 17 жовтня 2012 року «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук».

Таким чином, здобувач – Куперман Марина Володимирівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

14 січня 2020 року

Офіційний опонент

Доктор хімічних наук, провідний науковий співробітник завідувач лабораторії макроциклічних сполук і гібридних структур Інституту загальної та неорганічної хімії імені В.І. Вернадського НАН України

Підпис Чернія В.Я. засвідчую:

вчений секретар Інституту загальної та неорганічної хімії імені В.І. Вернадського НАН України кандидат хімічних наук



В.Я. Черній

Л.С. Лисюк