

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу ЧЕРНІЙ Світлани Вікторівни

"Дослідження фталоціанінових комплексів з аксіально-координованими замісниками як інгібіторів амілоїдної агрегації білків", представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

З'ясування молекулярних механізмів великомасштабної агрегації білків з утворенням амілоїдних фібрил залишається важливою проблемою молекулярної біології. Ця галузь є також дуже суттєвою для медицини, оскільки структурні перебудови в білках та наступна агрегація лежать в основі багатьох – так званих конформаційних – захворювань. Дисертаційна робота С. В. Черній в основному присвячена пошуку нових інгібіторів амілоїдної агрегації білків та вивченню механізмів їхньої дії. Зважаючи на недостатність знань щодо механізмів утворення амілоїдних фібрил та, ще важливіше, потенційне застосування таких інгібіторів у медицині, тему дисертаційної роботи слід визнати **актуальною** – як у прикладному, так і у фундаментальному аспектах.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, а також підтримана кількома грантами.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 156 сторінок основного тексту і 3 додатки. Дисертація ілюстрована 45 рисунками і 14 таблицями, список використаних джерел містить 165 посилань. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 19 публікацій, в тому числі 6 статей у фахових наукових виданнях: усі статті надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus, серед них 4 – у журналах з імпаکت-фактором на рівні між 1 і 3 (квартилі 2 та 3). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо амілоїдної агрегації білків, методів її дослідження та відомих інгібіторів фібрилоутворення амілоїдогенних білків є стислим, але змістовним – таким, що демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної біології та біофізики, описаних у Розділі 2: флуоресцентна спектроскопія, електронна мікроскопія, атомно-силова мікроскопія, спектроскопія динамічного розсіювання світла, поверхнево підсилена раманівська спектроскопія тощо.

Робота С. В. Черній мала на меті знайти серед набору макроциклічних металокомплексів (фталоціанінів та порфіразинів) ефективні інгібітори амілоїдної агрегації інсуліну та лізоциму, охарактеризувати процес фібрилоутворення у присутності цих сполук, встановити морфологічні особливості амілоїдних агрегатів та дослідити механізми дії інгібіторів. Отримані результати представлені у трьох розділах.

Розділ 3 присвячено аналізу процесу фібрилоутворення інсуліну та лізоциму у присутності ряду сполук (фталоціанінів та порфіразинів), що проявляють інгібуючу активність. Досліджено кінетику амілоїдної агрегації у присутності таких сполук, знайдено найбільш ефективні інгібітори, визначено їхню ефективну концентрацію (IC_{50}). Отримані результати свідчать, що у складі досліджених металокомплексів закритий центральний атом металу аксіально-координованих фталоціанінів не впливає, а відкритий атом металу планарних фталоціанінів впливає на інгібуючу активність. Представлено також результати щодо характеристики нових флуоресцентних барвників, які можуть бути використані як зонди для визначення амілоїдних фібрил.

У розділі 4 представлено результати ретельного дослідження морфології амілоїдних фібрил інсуліну та лізоциму за відсутності та у присутності ряду знайдених у попередньому розділі інгібіторів методами мікроскопії (електронної та атомно-силової) і спектроскопії динамічного розсіювання світла. Автором показано, що досліджені інгібітори фібрилоутворення суттєво

впливають на розміри та форму амілоїдних агрегатів, причому ці ефекти залежать від конкретної структури макроциклів. В цілому, отримані дані підтверджують результати попереднього розділу.

Розділ 5, який викликає особливий інтерес, присвячено дослідженням, спрямованим на з'ясування механізмів дії досліджених інгібіторів. Автором продемонстровано, що деякі фталоціаніни мають високу здатність до стекінгу у водних розчинах. Виявилось, що саме ці сполуки і проявляють вищу інгібуючу активність. Базуючись на дослідженні взаємодії таких фталоціанінів із мономерними білками та амілоїдними фібрилами, автор переконливо обґрунтовує існуюче припущення про те, що в основі інгібуючої дії лежать стекінг-взаємодії досліджених сполук з ароматичними амінокислотними залишками.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи С. В. Черній полягає в тому, що в ній вперше охарактеризовано ряд макроциклічних сполук, які проявляють інгібуючу дію на процеси утворення білкових амілоїдних фібрил, досліджено взаємодію цих сполук з білками та їхніми агрегатами, представлено докази на користь механізмів інгібуючої дії шляхом взаємодії макроциклів із ароматичними амінокислотними залишками. Представлені у роботі дані збагачують знання щодо процесів амілоїдної агрегації білків і механізмів інгібування таких процесів. Досліджені у роботі сполуки можуть бути використані як ефективні інгібітори фібрилоутворення, отримані результати – для розробки нових антифібрилогенних агентів. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузях молекулярної біології і медицини, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням принципів структурної організації білків і пошуком нових підходів у лікуванні захворювань.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, узгодження

отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати загальну **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Проте, до дисертаційної роботи С. В. Черній виникли наступні зауваження та запитання.

1. Для реєстрації кінетики амілоїдної агрегації у роботі застосовано флуоресцентний барвник 7519, який має підвищену спорідненість до β -структурних шарів амілоїдних агрегатів. Загалом, отримані результати не викликають сумніву, але виникають наступні технічні питання.

– Для збудження флуоресценції використовували довжину хвилі 580 нм, а для реєстрації – 590 нм (напевно, ці значення відповідають максимумам спектрів збудження і флуоресценції?). Такі близькі значення можуть потенційно призводити до внеску розсіювання збуджуючого світла у флуоресценцію, що реєструється (залежно від спектральної ширини щілини флуориметра), – особливо за умови формування білкових агрегатів, які повинні інтенсивно розсіювати світло. З іншого боку, флуоресценція також може інтенсивно розсіюватись білковими агрегатами, що може призвести, навпаки, до зниження інтенсивності флуоресценції, що реєструється. Чи брались до уваги можливі ефекти розсіювання світла?

– При такому значному перекриванні спектрів поглинання і флуоресценції, випромінювання барвника повинно ефективно поглинатись самим барвником (ефект внутрішнього фільтра, що залежить від концентрації барвника). Чи брали до уваги цей ефект?

– Чи не здатні застосовані інгібітори поглинати світло в області збудження чи флуоресценції барвника (ще один ефект внутрішнього фільтра, який залежить від співвідношення концентрації барвника та інших хромофорів)?

– Чи не здатні застосовані інгібітори гасити флуоресценцію барвника?

2. Не зрозуміло, чому на рис. 3.3 кінетична крива фібрилоутворення вільного інсуліну представлена двічі, причому дві криві суттєво розрізняються.

3. З рис. 3.6 очевидно, що процес фібрилутворення супроводжується довгохвильовим зсувом спектру власної (триптофанової) флуоресценції лізоциму і зниженням її інтенсивності. Обидва ефекти (як і зауважує автор стосовно максимуму спектру) можуть свідчити про підвищення ступеня експонованості триптофанових залишків до води. При цьому обидва ефекти проявляються приблизно однаково для вільного лізоциму і білка у присутності одного з інгібіторів. Невелика різниця між двома кривими або знаходиться у межах похибки, або проявляється у відхиленні від загального тренду буквально однієї точки (2 години і 6 годин для максимуму спектру лізоциму у присутності інгібітора і вільного лізоциму відповідно). На мій погляд, представлені дані не дають автору солідних підстав міркувати про "збільшенням гідрофобності середовища навколо Trp на ранніх стадіях реакції (сине зміщення)". Крім того, на панелі *б* рисунку ордината помилково позначена як "максимум флуоресценції білка" (на панелі *а* також краще було написати "максимум спектру флуоресценції").

4. На рис. 3.8, 3.9 (єдиний випадок у всій роботі) не представлено похибки. Невже там було по одному незалежному експерименту?

5. З підпису до рис. 5.1 залишається незрозумілим, чому відповідають спектри F і G на панелі *а* (аналогічно – для першого рисунку у додатку В). Крім того, якщо на панелі *а* дійсно спостерігається зміна співвідношення двох смуг у спектрі поглинання при підвищенні концентрації інгібітора, на панелі *б* така зміна не виглядає очевидною.

6. У тексті дисертації зустрічаються поодинокі друкарські, стилістичні і пунктуаційні помилки.

Наведені зауваження жодним чином не впливають на загальну *високу* оцінку розглянутої роботи.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Черній Світлани Вікторівни "Дослідження фталоціанінових комплексів з аксіально-

координованими замісниками як інгібіторів амілоїдної агрегації білків“ є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри загальної та медичної генетики
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка

А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка

