

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Вус Катерини Олександрівни «Флуоресцентне детектування амілоїдних фібрил»,**

яка подана на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за

спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Дисертаційна робота К.О. Вус присвячена актуальній проблемі сучасної біофізики, а саме встановленню фізичних механізмів взаємодії нових потенційних флуоресцентних маркерів бензантронового, скварайнового та бензотіазольного класів з амілоїдними фібрилами (АФ) – специфічними агрегатами деяких білків, які утворюються та відкладаються в різних органах та тканинах організму. *Актуальність* обраної теми зумовлена тим фактом, що, згідно сучасних уявлень, порушення метаболізму певних білків та пептидів, яке призводить до утворення АФ, є ключовим фактором в етіології низки нейродегенеративних та конформаційних захворювань, таких як хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантингтона, діабет другого типу, ревматоїдний артрит та інших, які на даний час є невиліковними. Отже рання діагностика утворення АФ та пре-фібрилярних агрегатів (протофібрил та білкових олігомерів) за допомогою, у тому числі, і флуоресцентних методів є першорядним завданням. Треба зазначити, що кількість публікацій стосовно використання флуоресцентних зондів у діагностиці АФ за останні 15 років збільшилась майже в 5 разів (аналіз публікацій в базі SCOPUS), що також вказує на перспективу використання саме флуоресцентних методів в детекції АФ. Але, якщо перші публікації були присвячені пошуку зондів, які зв'язуються з фібрилами для їх візуалізації та детектування, то останні публікації свідчать про потребу дослідників у флуоресцентних зондах, які були б чутливі до різної морфології АФ, мали б низьку чутливість до нативного білка, також мали б високу спорідненість до пре-фібрилярних агрегатів, оскільки дослідження останніх років вказують, що саме вони є найбільш токсичними для клітин. Тобто зрозуміло, що подальше вдосконалення діагностики конформаційних захворювань потребує пошуку більш ефективних амілоїдних маркерів, а результати дисертаційної роботи, яка присвячена саме цій задачі, мають конкретні *перспективи практичного застосування* у медичній діагностиці. Слід зазначити, що дисертаційна робота виконувалась відповідно до затверджених планів науково-дослідних робіт Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна в рамках чотирьох держбюджетних тем. Важливо також відзначити, що тема дисертаційної

роботи безпосередньо пов'язана з таким пріоритетним напрямком розвитку науки і техніки, визначеним Верховною Радою України, як здоров'я людини.

Отже, обрана тема дисертації та поставлені в роботі наукові завдання *є безумовно актуальними*.

*Обґрунтованість наукових висновків дисертації та їх достовірність* не викликає сумнівів завдяки використанню в роботі надійних та добре розвинутих спектроскопічних методів, всебічного глибокого аналізу експериментальних результатів з використанням різних моделей. Безумовно, сильною стороною роботи є використання саме різних сучасних спектроскопічних методів, а також комп'ютерного моделювання для з'ясування характеру та механізмів зв'язування флуоресцентних зондів з АФ і побудови адекватної моделі цього процесу. Експерименти проведено на сучасному експериментальному обладнанні.

*Наукова новизна роботи* полягає у тому, що більшість результатів дисертації отримано вперше. Серед отриманих результатів, найцікавішими, на мій погляд, є такі:

1. Вперше отримано інформацію щодо взаємодії нових флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами, утвореними *in vitro*. Проведено оцінку термодинамічних параметрів процесу асоціації досліджуваних флуорофорів з патогенними білковими агрегатами.
2. Аналіз чутливості зондів до амілоїдних фібрил дозволив виявити найбільш перспективні потенційні амілоїдні маркери. Деякі сквараїнові та бензантронові зонди виявили вищу специфічність до фібрил лізоциму певної морфології ніж традиційний зонд Тіофлавін Т. Знайдено зонди з найбільшою чутливістю до морфології амілоїдних фібрил.
3. Встановлена наявність лише одного типу сайтів зв'язування – жолобків вздовж головної осі амілоїдної фібрили для більшості нових зондів та наявність додаткових неспецифічних сайтів для деяких барвників.
4. При вивченні індуктивно-резонансного переносу енергії між тіофлавіном Т та досліджуваними флуорофорами зроблено припущення про локалізацію бензантронових зондів у збагачених ароматичними амінокислотами жолобках фібрил інсуліну, лізоциму та фрагменту 1-83 аполіпротеїну А-І.

В цілому дисертаційна робота справляє досить приємне враження. Рукопис складає 227 сторінок, містить 73 рисунка, 31 таблицю і додаток. Список використаних джерел складається з 404 найменувань.

Згідно до вимог, дисертаційна робота *складається з вступу, п'яти розділів, висновків та додатку*. Розділи добре структуровані, кожний розділ закінчується висновками.

Матеріали дисертаційної роботи викладено послідовно і ясно, у відповідності до існуючих стандартів для наукової мови. Робота добре проілюстрована, більшість рисунків виконано якісно. Деякі експериментальні данні та виконання на їх основі розрахункові параметри наведено в таблицях, що покращує сприйняття результатів досліджень у цілому.

У вступі дисертаційної роботи К.О. Вус проаналізовано сучасний стан діагностики нейродегенеративних та конформаційних захворювань за допомогою флуоресцентних маркерів. У вступі також сформульовано мету та наукові завдання дисертаційної роботи, визначено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, а також наведено дані про апробацію роботи та публікації автора.

*Перший розділ* є оглядовим, у якому автором надано сучасні уявлення щодо будови фібрилярних агрегатів, їх властивостей, біологічної ролі та кінетичних аспектів фібриляції білка. Розглянуто молекулярні механізми взаємодії існуючих флуоресцентних зондів з АФ, надано критичний огляд існуючих на теперішній час маркерів та зазначені їх переваги і недоліки.

Для вирішення завдань, що були поставлені у дисертаційній роботі, було використано декілька методів приготування АФ різної морфології та застосовано ряд сучасних фізичних методів для дослідження їх взаємодії з новими флуоресцентними зондами, а саме, флуоресцентна спектроскопія, спектрофотометрія, часороздільна флуоресцентна спектроскопія, електронна мікроскопія, спектроскопія кругового дихроїзму, квантово-хімічні розрахунки, комп'ютерне моделювання, опису яких присвячено *другий розділ* роботи.

Оцінюючи оригінальні розділи дисертації, хочу відзначити, що експериментальна частина роботи була добре спланована та систематизована. Основним завданням роботи було встановлення найбільш ефективних флуоресцентних зондів за низьких показників, які можуть бути використані у якості амілоїдних маркерів. Тому на першому етапі роботи, якому присвячено *третій розділ*, спектроскопічними методами проводились дослідження ефективності процесу зв'язування нових флуоресцентних зондів трьох різних класів (бензантронові, скварайнові зонди та похідні Тіофлавіну Т) з АФ різної морфології. За допомогою флуоресцентного титрування визначено параметри зв'язування з АФ, методами флуоресцентної спектроскопії вивчено фізико-хімічне оточення зондів у фібрилах лізоциму та визначено сайти зв'язування зондів з агрегатами белка. Аналіз отриманого експериментального матеріалу дозволив зробити висновок стосовно високої чутливості нових флуоресцентних зондів до фібрил лізоциму та інсуліну, і незначної – до нативного білка, що створює передумови для їх використання у якості амілоїдних маркерів *in vitro*. Відібрано найбільш чутливі зонди у кожному класі, показано наявність лише одного типу сайтів зв'язування для більшості зондів – жолобків вздовж головної осі амілоїдної фібрили.

**Четвертий розділ** дисертаційної роботи присвячено вивченню спектральних параметрів нових зондів у різних розчинниках, а також дослідженню залежності чутливості флуоресцентних сполук до амілоїдних фібрил при варіюванні зовнішніх умов комплексоутворення – рН та іонної сили. Отримані авторкою експериментальні данні дозволили зробити висновок, що краща область детектування фібрил за допомогою бензантронів та скварайнів відповідає значенням рН 7,4 та іонної сили не більше 0,15 М.

На останньому етапі проводились квантово-хімічні розрахунки та кореляційний аналіз для визначення детермінантів амілоїдної специфічності нових зондів, чому й присвячено **п'ятий розділ** дисертаційної роботи. На основі квантово-хімічних розрахунків та QSAR аналізу автором вперше встановлено позитивну кореляцію між чутливістю до амілоїдних фібрил найкращих маркерів бензантронного ряду та такими молекулярними дескрипторами, як ліпофільність, ширина молекули зонда і сума зарядів на атомах азоту. Отримані данні також пояснюють низьку чутливість похідних ThT до амілоїдних фібрил, а саме вірогідність утворення у цих молекул збудженого стану з внутрішньмолекулярним переносом заряду та обертанням фрагментів молекул (TICT).

Зазначу, що дисертаційна робота виконана на високому науковому рівні і свідчить про високу фахову та кваліфікаційну підготовку здобувачки. Однак, при загальній позитивній оцінці роботи, слід зробити наступні зауваження.

(1). Перш за все хочу відмітити занадто велику кількість флуоресцентних зондів, обраних для аналізу, а саме 39 молекул, які згруповані у 3 класи: бензантронів, скварайнові похідні та похідні тіофлавіну. На мою думку, така велика кількість об'єктів дослідження суттєво ускладнила роботу дисертантки, щодо узагальнення отриманих результатів, оскільки навіть молекули одного класу виявили різні, у деяких випадках, протилежні властивості. Молекули відрізняються різними замісниками (функціональними групами), які вводились у різні положення, роль яких у подальшій роботі детально не аналізується, тому, більш ефективним було б обрати один клас флуоресцентних зондів та відстежити вплив зміни структури на здатність зв'язування з фібрилами, або значно зменшити кількість молекул у кожній групі, оскільки деякі з них виявились менш ефективними та не виявили ніякої специфічності в порівнянні з традиційними зондами тіофлавіном Т та нільським червоним.

(2). п.3.1.1., стор. 77 та далі, аналізуючи ефективність взаємодії бензантронних зондів з фібрилами лізоциму та нативним лізоцимом за допомогою ізотерм зв'язування та отриманого параметру  $K_a$  (константа асоціації), автор робить припущення, що сайти зв'язування деяких зондів менш полярні у нативного лізоциму, тобто параметр  $K_a$  є чутливим до полярності оточення, а для інших барвників – до в'язкості оточення. На мій погляд, таке твердження не є коректним, оскільки константа асоціації залежить тільки від природи

реагуючих речовин та температури. Що саме автор називає «сайтами зв'язування» у випадку бензантронових зондів (які саме фрагменти молекул або функціональні групи) та у випадку фібрил? У біохімії під сайтами зв'язування мають на увазі специфічні взаємодії типу «антитіло-антиген» та інших лігандів з рецепторами за допомогою зворотних нековалентних зв'язків, які утворюють специфічні ланки у взаємодіючих молекулах. Вважаю, що більш коректніше говорити про комплексоутворення між молекулами зондів та фібрилами лізоциму або молекулами нативного білка, в першому випадку зонди розташовуються у жолобках фібрил, на що й вказує сама авторка роботи (стор. 77, наприкінці першого абзацу). Зміни спектральних параметрів зондів (збільшення інтенсивності флуоресценції та зсув спектрів) при взаємодії флуоресцентних зондів з фібрилами та нативним лізоцимом свідчить як раз про певну чутливість структури зондів до полярності та в'язкості мікрооточення, а не про чутливість параметру  $K_a$  до цих параметрів.

(3). п.3.1.3, стор.92, автор вказує, що при зв'язуванні зонда 1,8-АНС з фібрилами інсуліну спостерігається довгохвильовий зсув максимуму спектру флуоресценції та майже 8-кратне зростання інтенсивності флуоресценції, що означає вищу полярність мікрооточення зонду (у дисергантки – сайтів зв'язування) ніж у випадку фібрил лізоциму. Зсув спектру флуоресценції у довгохвильову область спектру може вказувати на більшу полярність мікрооточення зонду, але збільшення інтенсивності флуоресценції – ні, оскільки у більш полярних середовищах, навпроти, спостерігається гасіння флуоресценції. У даному випадку, збільшення інтенсивності флуоресценції як раз підтверджує взаємодію зондів з фібрилами, зв'язування з ними, за рахунок чого (стеричні обмеження) спостерігається блокування каналів безвипромінювальної релаксації енергії електронного збудження. Такі неточності автора дисертації (теж саме відноситься до пункту 2) вносять певні непорозуміння та ускладнюють сприйняття роботи.

(4). На рис.3.3, стор.72 та рис. 3.15, стор. 93 наведено спектри флуоресценції зондів у присутності та за відсутності фібрил. У випадку флуоресценції зондів без фібрил в спектрах спостерігається додаткова короткохвильова смуга, яка повністю відсутня в спектрах при наявності у розчинах фібрил. З чим пов'язана ця смуга?

(5). п.3.1.4., стор.97 не зрозуміла ідея автора збуджувати флуоресценцію декількома довжинами хвиль (різними для різних флуорофорів) при дослідженні взаємодії скварайнових зондів з фібрилами лізоциму та інсуліну, оскільки спектри поглинання не наводяться.

(6). Обговорюючи вибір ефективних донорно-акцепторних пар при дослідженні безвипромінювального переносу енергії електронного збудження, п.3.3., стор.125, доцільно було б навести значення інтегралів перекриття спектрів ( $J(\lambda)$ ) для цих пар та навести рівняння, за яким вони були розраховані. Також, на стор. 124 вказано, що ефективність

переносу енергії  $E$  оцінювали згідно рівняння, наведеного у п.2.6.4. (стор.66), але рівнянні наведено з помилкою, повинно бути  $E = I \cdot F_{DA} / F_D$ .

(7). Дискусійним є зауваження щодо інтерпретації результатів спектральних зсувів для амідно похідних бензантрон у неполярних розчинниках (п.4.1., стор.136), а саме спостереження у неполярному розчиннику гліцерині короткохвильової флуоресценції замість полоси з максимумом близько 600 нм, що реєструється у полярних розчинниках, таких як DMSO та DMF. Вважаю, що такі спектральні зміни як раз і можна пояснити утворенням у полярних розчинника так званих ПІСТ станів, які характеризуються появою довгохвильової смуги випромінювання, яка відсутня у неполярних розчинниках. При утворенні ПІСТ станів ключовим фактором є саме полярність розчинника, оскільки їх утворення пов'язано із релаксацією молекул розчинника навколо молекули флуорофора. Авторка вказує, що такі спектральні зміни не спостерігались у присутності амілоїдних фібрил (тобто у менш полярному середовищі), хоча данні розділу 3.1.1, табл. 3.1 однозначно свідчать, що для вказаних похідних має місце короткохвильовий зсув спектрів (для деяких – понад 100 нм) при зв'язуванні з фібрилами, що як раз і можна пояснити випромінюванням з І.Е збудженого стану у неполярному оточенні і є додатковим доказом зв'язування флуорофорів з фібрилами та блокування обертання фрагментів молекул друг відносно друга.

(8) У дисертації присутні також технічні та стилістичні недоліки. Так, має місце невдале вживання деяких термінів. Наприклад, «внутрішні флуорофори», «закручений збуджений стан.» (замість «стан внутрішньомолекулярного переносу заряду з поворотом фрагментів молекули»), «двогранний кут між донором та акцептором молекули» (замість «...донорним та акцепторним фрагментами молекули»).

На стор. 48 є посилання на рис.1.7, якого немає в тексті (має бути рис.1.6),

п.2.6.1. в формулах не пропечатані деякі символи.

стор.59, рис.2.6 немає панелі А і Б, є «ліворуч», «праворуч», хоча в тексті є посилання на рис. 2.6А и Б.

в авторефераті дисертації, табл.3 наведено однакові данні стосовно максимуму випромінювання флуоресценції флуорофорів у присутності та за відсутності фібрил.

Наведені зауваження не впливають на достовірність наукових висновків та не знижують загальної високої оцінки роботи.

Аналіз роботи та опублікованих здобувачкою зі співавторами наукових праць надає змогу зробити висновок, що дисертаційна робота К.О. Вус є *завершеним науковим дослідженням*, в якому успішно виконано поставленні задачі та отримані нові достовірні експериментальні результати, що в сукупності *вносять вагомий вклад* у розвиток галузі



молекулярної біофізики, що пов'язана з вивченням фізичних механізмів взаємодії органічних молекул (флуоресцентних зондів) та специфічних білкових агрегатів.

**Наукова значущість** дисертації полягає у отриманні науково обгрунтованих даних стосовно механізмів взаємодії нових флуоресцентних зондів різних класів з амілоїдними фібрилами білків різної морфології, що можуть бути надійним підґрунтям для створення нових діагностичних систем для детектування конформаційних захворювань *in vitro* та *in vivo*.

**Практична значущість** роботи полягає в тому, що отримані дані щодо найбільш ефективних сполук дозволяють запропонувати їх у медичній діагностики у якості амілоїдних маркерів чутливих до морфології фібрил.

Основні результати роботи повністю викладено у **8 статтях** у міжнародних та вітчизняних фахових журналах та **16 тезах доповідей** на міжнародних і національних конференціях.

Тема дисертації **відповідає спеціальності 03.00.02** — біофізика. **Автореферат** повністю відображає зміст дисертації.

Вважаю, що за обсягом проведених досліджень, їх високим науковим рівнем, новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертаційна робота «Флуоресцентне детектування амілоїдних фібрил» **повністю відповідає всім вимогам п.9, 11 та 13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567, які висовуються до кандидатських дисертацій.** Авторка роботи **Вус Катерина Олександрівна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.**

Офіційний опонент,

Зав. відділу нанокристалічних матеріалів  
Інституту єдинтиляційних матеріалів НАН України,  
доктор фізико-математичних наук, с.н.с.



С.Л. Єфімова

29 лютого 2016 р.

Особистий підпис Єфімової С.Л.

ЗАСВІДЧУЮ

Учений секретар Інституту єдинтиляційних матеріалів  
Національної академії наук України  
кандидат технічних наук



Ю.М. Дацько