

ВІДЗИВ  
офіційного опонента  
на дисертацію САДЧЕНКО Аліни Олегівни  
«Фізичні механізми впливу біологічно активних субстанцій  
на фазовий стан модельних фосфоліпідних мембран»,  
представлену на здобуття наукового ступеня  
кандидата фізико-математичних наук  
зі спеціальності 03.00.02 – біофізика

Дисертація А.О.Садченко присвячена одній з актуальних і важливих задач сучасної біофізики – з'ясуванню молекулярних механізмів взаємодії речовин різної хімічної природи з ліпідними мембранами та їх впливу на фазовий стан ліпідного бішару. Незважаючи на те, що загальні уявлення про цей вплив склалися ще кілька десятиріч тому, багато аспектів залишаються нез'ясованими, і останніми роками в світовій літературі продовжують з'являтися численні статті, присвячені особливостям взаємодії тих чи інших нових фармпрепаратів та інших біологічно активних речовин складної хімічної будови з клітинними мембранами – як нативними, так і модельними, якими, як правило, слугують ламелярні структури гідратованих фосфатидилхолінів та інших фосфоліпідів. В рецензованій роботі досліджено мембранотропну поведінку багатьох речовин різних хімічних класів, в тому числі тих, що раніше не досліджувалися у цьому контексті. Зроблено спробу узагальнення зв'язку між параметрами молекулярної структури речовини з характеристиками її мембранотропної дії. Таким чином тема дисертації А.О.Садченко, є актуальною та відповідає спеціальності «біофізика» за об'єктами, підходами та методами дослідження.

В першому розділі дисертації надано огляд сучасних уявлень про структуру фосфоліпідних мембран, зокрема, як ліотропних рідкокристалічних структур, та фазові переходи між станами з різним характером впорядкування, підсумовано наявні дані про вплив неліпідних компонентів на фазові переходи, а також описано основні біофізичні методи досліджень модельних мембран. Незважаючи на стислість викладу, враховано основні класичні роботи з цієї тематики, а також наведено і результати кількох

найновіших робіт, включно з опублікованими в 2016 р. На основі проведеного аналізу літератури сформульовано задачі дисертаційної роботи.

Другий розділ присвячено опису використаних в роботі речовин і систем та методів їх експериментальних досліджень. Основою модельних мембран слугував стандартний для таких досліджень фосфоліпід DPPC (в роботі названий кириличною аббревіатурою ДПФХ), а також, для деяких експериментів, його гомолог DMPC (в роботі ДМФХ). Біологічно активними субстанціями (БАС), що їх вносили в ліпідний бішар, слугували речовини різних хімічних класів та фармакологічних груп. Інформативність підсилюється наведеними в додатку до дисертації формулами та молекулярними моделями досліджених речовин. Коротко описано експериментальні методи досліджень – диференціальна скануюча калориметрія (ДСК), Фур'є-ІЧ спектроскопія, малокутове розсіювання рентгенівських променів, а також методи квантово-хімічних розрахунків, комп'ютерного моделювання та обробки даних.

В третьому розділі викладено методологічний підхід, на основі якого визначено мембранотропну активність БАС різних хімічних класів. Показано, що більшість БАС знижує температуру переходу модельної мембрани в  $L_{\alpha}$ -фазу пропорційно їх вмісту в мембрані. Детально проаналізовано окремі винятки, коли ця температура, навпаки, збільшується або коли спостерігається поява додаткових піків на ДСК-термограмі та інших ознак фазового розділення. Вперше в якості неліпідних компонентів мембран використано кріопротектори на основі оксиетильованих похідних гліцерину та віднайдено низку особливостей таких систем, пов'язану з сольватуючою здатністю, зокрема, можливість майже повного заміщення води в гідратованому ДПФХ без зміни фазового стану. На основі даних малокутового рентгенівського розсіювання встановлено, що характер зміни періода повторюваності ламелярної структури  $D$  з температурою в  $L_{\alpha}$ -фазі корелює з напрямком зміни  $D$  при внесенні відповідної БАС у висхідний фосфоліпід.

Четвертий розділ присвячено дослідженню сукупної дії різних БАС при їх спільному внесенні в фосфоліпідну мембрану. Тут вперше для подібних об'єктів застосовано т.зв. метод квазібінарних систем – в матрицю гідратованого ДПФХ вносили пари різних БАС, при чому загальна концентрація внесених БАС залишалась постійною, а їх співвідношення змінювалось від 0 до 100%. Показано, що сукупна мембранотропна дія БАС внаслідок взаємодії їх молекул в середовищі мембрани може якісно відрізнитися від дії кожної БАС окремо. Для конкретних прикладів аналізується можливість утворення міжмолекулярних комплексів (бісчетвертинні амонієві сполуки - аспірин) або опосередкована взаємодія через конкурентну адсорбцію (нітрат срібла - нітрати лужних

металів). Цікавим видається підтвердження зроблених припущень шляхом використання в аналогічних експериментах різних пар речовин, для яких утворення чи неутворення комплексів є доведеним для умов термотропної рідкокристалічної фази. Цікавою є виявлена в роботі різниця мембранотропної дії активних речовин фармпрепаратів та фармпрепаратів-аналогів.

Логічним підсумовуванням результатів роботи є п'ятий розділ, присвячений теоретичному аналізу кореляцій між молекулярними параметрами БАС та їх мембранотропною дією. Зроблено спробу віднайдення певної кореляції між молекулярними параметрами, розрахованими квантово-хімічними методами, та експериментально визначеним впливом цих БАС на температури фазових переходів. Цими параметрами були молекулярний об'єм, площа поверхні молекули, дипольний момент, ступінь анізотрії, відносний розмір полярної частини молекули тощо. Виокремлено певні групи речовин, в межах яких коефіцієнт кореляції виявляється досить великим (на рівні 0,8 – 0,9 і більше). Запропоновано класифікацію досліджених БАС за переважним механізмом їх взаємодії з фосфоліпідною мембраною (адсорбція на поверхні розділу «полярна частина молекули ліпиду – вода» або абсорбція в об'ємі ліпідного бішару).

В цілому дисертація справляє гарне враження. Вона написана строгою класичною науковою мовою та оформлена належним чином. Справляє враження великий обсяг експериментальних результатів, отриманих різними методами та їх ґрунтовне порівняння з наявними літературними даними. Це, на мій погляд, не залишає сумнівів в достовірності отриманих результатів та обґрунтованості зроблених висновків. Безсумнівною є і наукова новизна основних результатів роботи, які опубліковано в 9 статтях в фахових журналах та розділі колективної монографії. Чотири роботи опубліковано в закордонних наукових виданнях. Апробація роботи на численних міжнародних та вітчизняних конференціях є достатньою та засвідчує інтерес наукової спільноти до цієї роботи та високу оцінку як отриманих результатів, так і кваліфікації А.О.Садченко як сформованого вченого-біофізика.

Разом з тим дисертація викликає ряд питань та зауважень.

Зауваження:

1. Одним з основних зауважень до роботи є використання виключно монокомпонентних модельних мембран, що складаються з насичених ліпідів. Такі моделі є занадто спрощеними, і екстраполювати отримані на них результати на

реальні клітинні мембрани досить важко. По-перше, реальні мембрани ссавців містять в основному моно- та поліненасичені фосфоліпіди, а насичена фракція складається в основному із сфінгомієлінів. З огляду на це, використання мононенасиченого фосфоліпіду DOPC замість DPPC було б, на мою думку, більш доречним та цікавим. По-друге, фазові характеристики реальних еукаріотичних мембран критичним чином залежать від вмісту холестеролу, який жодним чином не можна перевірити у монокомпонентних системах. Таким чином рекомендації щодо використання отриманих результатів для оцінки дії фармпрепаратів на реальні мембрани є занадто оптимістичними.

2. Я не погоджуюся з тим, що результати роботи можуть безпосередньо використовуватися у передклінічних дослідженнях лікарських препаратів. Отримані результати дійсно можуть бути корисними у фармакологічних дослідженнях, але скоріше у якості ідеалізованого контролю, ніж у якості моделі поведінки реальних мембран у реальних фізіологічних умовах. Як слушно вказано у меті та задачах роботи, вона є фізичною, і в цій якості до неї немає суттєвих претензій.
3. Аббревіатури ліпідів варто завжди подавати латиницею — DPPC, DMPC. Кириличні аббревіатури, на кшталт ДПФХ, фахівцям не звичні і потребують постійного перекладу, що сильно ускладнює сприйняття роботи.
4. Використання терміну “фосфоліпідні мембрани” по відношенню до реальних клітинних мембран не є коректним, і його слід уникати. Реальні мембрани, крім фосфоліпідів, містять багато інших ліпідів та неліпідних компонентів.
5. Я б рекомендував уникати надмірного використання терміну “біологічно активні речовини” (БАС), оскільки він є занадто неконкретним і поза пост-радянською науковою школою практично не використовується. Певну біологічну дію мають практично всі відомі речовини в природі.
6. Як правило, у медико-біологічних та фармацевтичних дослідженнях найголовнішими чинниками є проникність мембран для фармпрепаратів або деструктивний вплив препарату на мембрани (бактерій, ракових клітин, тощо). Саме це як правило мається на увазі під “мембранотропною дією”. В даній роботі цей термін має інший зміст і використовується виключно для позначення впливу речовин на параметри фазових переходів модельних мультиламелярних мембран. Це потребує додаткового пояснення, яке варто було б надати на початку роботи.

7. З роботи не зрозуміло, по якому принципу було обрано речовини для дослідження. Їх набір є досить еkleктичним, і варто було б більш детально пояснити причини вибору кожної конкретної речовини.

Питання:

1. Чи проводилися дослідження на ліпосомах чи ліпідних агрегатах іншої топології? Які можливі відмінності від мультиламелярних систем варто очікувати для ліпосом?
2. Чим обумовлене використання напівемпіричних методів квантової хімії для розрахунку молекулярних характеристик речовин у розділі 5? Чи проводилося порівняння впливу рівня теорії на результати?
3. Чи проводилися квантовохімічні розрахунки для різних значень діелектричної сталої середовища, що є моделлю водного або ліпідного гідрофобного оточення? Якщо ні, то чому, бо континуальні моделі розчинника практично не впливають на складність та тривалість розрахунків.
4. Чи робилися спроби оцінити проникність мембран для фармпрепаратів та оцінки коефіцієнту розподілу препаратів між мембранною та водною фазами?
5. Як співвідносяться використані в роботі концентрації фармпрепаратів з їх терапевтичними та гранично припустимими концентраціями в організмі? Чи спостерігаються отримані в роботі ефекти при реальних терапевтичних концентраціях препарату?

Наведені зауваження не знижують загальну позитивну оцінку роботи. Окрім наукового значення для біофізики мембран, результати дисертації А.О.Садченко мають певне практичне значення. Встановлені в роботі методи виявлення різниці мембранотропної дії фармпрепаратів-аналогів, а також ефектів сукупної дії фармпрепаратів при їх спільному застосуванні можуть, із застереженнями щодо спрощеності модельних систем, бути використані у фармакологічних дослідженнях. Можна рекомендувати використання результатів дисертації в науково-дослідних інститутах НАН України біофізичного та медико-біологічного профілю, на кафедрах біофізики та ядерної і медичної фізики Харківського національного університету ім.В.Н.Каразіна, тощо.

Дисертація А.О.Садченко, подана на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика, повністю відповідає паспорту

спеціальності. Вона є завершеною самостійною науково-дослідною роботою, в якій вперше отримані нові науково обґрунтовані результати, які в сукупності вирішують конкретну важливу і актуальну задачу сучасної біофізики - визначення механізмів індивідуальної та сукупної дії біологічно активних субстанцій на термодинамічні та структурні параметри модельних ліпідних мембран. Всі основні результати та висновки роботи належним чином опубліковані та пройшли апробацію. Автореферат повністю відповідає змісту дисертації. Ознак плагіату в дисертації не виявлено.

За обсягом проведених досліджень, актуальністю, ступенем обґрунтованості наукових положень і висновків, їх новизною та достовірністю, повнотою викладення, значимістю для науки, дисертація А.О.Садченко «Фізичні механізми впливу біологічно активних субстанцій на фазовий стан модельних фосфоліпідних мембран» повністю задовольняє вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Кабінетом Міністрів України від 24.07.2013 р. №567, із змінами, внесеними згідно із Постановами КМ № 656 від 19.08.2015 р. та № 1159 від 30.12.2015 р., які висуваються до кандидатських дисертацій, а її авторка - Садченко Аліна Олегівна - заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02-біофізика

Офіційний опонент

С.О. Єсилевський

доктор фізико-математичних наук,  
провідний науковий співробітник  
відділу фізики біологічних систем  
Інституту фізики НАН України

Підпис С.О. Єсилевського засвідчую:

Вчений секретар  
Інституту фізики НАН України  
к.ф.-м.н.



В.С. Манжара