

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Аверченко Катерини Андріївни «Механізми впливу редоксактивних наночастинок ($\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ і CeO_{2-x}) на біоенергетичні процеси в мітохондріях», представленої на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Останні десятиліття характеризуються розвитком нанотехнологій та галузей науки і техніки, пов'язаних з дослідженням та використанням наноматеріалів. Іде пошук шляхів застосування наноматеріалів у сучасній медицині та біотехнологіях. Тому накопичення експериментальних даних про властивості наночастинок, закономірності їх впливу на біологічні об'єкти є важливим етапом у розвитку цього напрямку. У зв'язку з цим тема дисертаційної роботи є актуальною і важливою для подальшого застосування наноматеріалів.

Наукова новизна представленої дисертаційної роботи полягає в тому, що вперше досліджена про- або антиоксидантна активність наночастинок на основі рідкісноземельних елементів в різних модельних системах в залежності від властивостей мікрооточення. Експериментально встановлено відмінності у механізмах проникнення наночастинок різних розмірів в клітини та їх безпосередній прооксидантний вплив на біоенергетичні процеси в мітохондріях, які є не тільки головною токсичною мішенню для активних форм кисню, але і, як показано в роботі, локусом впливу досліджених наночастинок на окислювальні процеси. Показано залежність прооксидантної дії наночастинок від стану глутатіон-залежних систем регуляції окислювального балансу клітин в організмах різного віку. Також в дисертаційній роботі з використанням кінетичної моделі процесів генерації активних форм кисню в мітохондріях обґрунтовані можливі механізми впливу наночастинок на основі рідкісноземельних елементів на редокс-процеси в них.

Практичне значення отриманих у дисертаційній роботі Аверченко К. А. даних полягають у тому, що отримані дані щодо механізмів впливу наночастинок на біоенергетичні процеси у клітинах, зокрема в мітохондріях, можуть бути використані для підбору наночастинок з відповідними характеристиками для створення терапевтичних агентів для корекції порушень в системах регуляції окислювального балансу під впливом різних факторів, у тому числі, унаслідок старіння організму.

Огляд літератури достатньо ґрунтовний, освітлює сучасний стан проблем, яких торкається дисертаційна робота. В цьому розділі детально розглянуто сучасний стан проблем застосування наночастинок в біології та медицині. Описані властивості наночастинок на основі рідкісноземельних елементів, їх вплив на вільнорадикальні процеси в біосистемах та механізми дії редоксактивних наночастинок на біоенергетичні процеси в мітохондріях. Також розглянуті підходи до характеристики мітохондріальних процесів на основі моделей, які можуть бути використані для пояснення дії редоксактивних наночастинок на біоенергетичні процеси в мітохондріях.

У розділі «Матеріали і методи» наведено загальну характеристику матеріалів та методів дослідження. Описано методику синтезу водних колоїдних розчинів наночастинок та їх характеристики, надані електронно-мікроскопічні зображення отриманих зразків. Метод динамічного розсіювання світла використовували для визначення розподілу наночастинок за розмірами. Подані також методи виділення біологічних об'єктів, а саме гепатоцитів, мітохондрій, на яких проводили дослідження. Оцінку впливу НЧ на інтенсивність генерації радикалів в біологічній системі проводили в умовах моделювання оксидативного стресу за допомогою H_2O_2 і t-BHP (трет-бутилгідропероксиду). Рівень пероксидації ліпідів визначали за накопиченням малонового діальдегіду в клітинах печінки. Для досліджень здатності наночастинок впливати на генерацію або інактивацію активних форм кисню і вільних радикалів використовували метод активованої хемілюмінесценції. Детально описаний метод вимірювання мітохондріального трансмембранного потенціалу за допомогою катіонного зонду JC-1. Кількісна флуоресцентна мікроскопія з мітохондріальним зондом JC-1 дозволяє контролювати $\Delta\Psi_m$ в поодиноких живих клітинах. Мікрофлуориметрія також дозволяє оцінювати профіль інтенсивності люмінесценції агрегатів і мономерів в окремій клітині, вивчати локальні зміни $\Delta\Psi_m$, і візуалізувати мітохондрії з низьким і високим потенціалом. Полярографічним методом досліджували інтенсивність дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях.

Для аналізу та інтерпретації отриманих результатів використовували кінетичну схему переносу електронів і утворення супероксида, запропоновану Маркевичем і Хоеком, яка описує основні шляхи перенесення електронів в електрон-транспортному ланцюзі і в головних центрах утворення АФК і лежить в основі обчислювальної моделі для мітохондріального дихального ланцюга. Тобто ми бачимо в роботі фундаментальні підходи не тільки в основній частині дослідження, а і для детальної характеристики досліджуваних зразків і процесів.

В основних розділах дисертаційної роботи Аверченко К.А. подано достатньо великий об'єм експериментальних даних щодо властивостей редоксактивних наночастинок на основі диоксиду церію і ортованадатів. Вивчені особливості впливу частинок обох видів різного розміру на окислювально-відновлювальні процеси в системах різної складності, а також на процеси генерації активних форм кисню та біоенергетичну функцію мітохондрій. В розділі 3 показано, що прооксидантні та антиоксидантні ефекти НЧ залежать від їх фізико-хімічних характеристик, а також і від властивостей системи-мішені. Так, у біосистемах, що містять мітохондрії, відбувається зміна антиоксидантних ефектів НЧ на прооксидантні, що свідчить про те, що мітохондрії є основною мішенню за дії редоксактивних НЧ. Зроблено висновок, що прооксидантні властивості малих НЧ можуть бути пов'язані з їх взаємодією з нанорозмірними клітинними структурами, в тому числі компонентами антиоксидантної системи захисту клітини. Показана ключова роль антиоксидантної захисної системи клітин в регуляції інтенсивності генерації вільних радикалів у присутності НЧ.

4 розділ присвячений вивченню впливу наночастинок на функціональні характеристики мітохондрій. За допомогою кількісної флуоресцентної мікроскопії з мітохондріальним зондом JC-1 показано зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій $\Delta\Psi_m$ в клітинах за дії наночастинок (крім діоксиду церію розміром 8-10 нм), що корелює з пригніченням процесів дихання і окислювального фосфорилування в ізольованих мітохондріях. Автор робить висновок, що вплив наночастинок на стан мітохондрій реалізується як через прооксидантну дію, так і шляхом прямої взаємодії з мітохондріальними білками і ферментами, що також є причиною порушення мітохондріальних процесів. Застосування кінетичної моделі, запропонованої Маркевичем і Хоеком, дозволила запропонувати можливі механізми пригнічення мітохондріальної активності наночастинок. Авторка показала, що вбудовування наночастинок в мембрани та безпосередня взаємодія з переносниками електронів може призводити до пригнічення транспорту електронів і активації утворення супероксида і перекису водню. Механізм може бути пов'язаний з інтеграцією наночастинок в електрон-транспортні процеси в мітохондріях у якості донорів або акцепторів електронів.

При дослідженні впливу наночастинок на мітохондріальний потенціал гепатоцитів щурів різного віку (розділ 5) автор переконливо показав роль антиоксидантної системи захисту клітин (зниження синтезу і рівня відновленого глутатіону (GSH) з віком) та функціонального стану мембран клітин.

Таким чином, в роботі отримано низку нових даних про вплив досліджених наночастинок на процеси в біологічних системах, які мають як теоретичне, так і практичне значення.

До дисертаційної роботи є такі зауваження.

1. Підписи під рисунками не завжди витримані в одному форматі. Так, на шести рисунках глави 3 (рис. 3.7-3.12) підписи під рисунками – «Вплив.....на інтенсивність генерації радикалів» або як варіант – «...на генерацію вільних радикалів», по осі ординат – «показник світлосуми у % від контролю». А на рис. 3.13, де подані результати, отримані тим же методом, – «Вплив ... на інтенсивність генерації радикалів», по осі ординат – «показник інтенсивності у відносних одиницях».

2. Іноді авторка при обговоренні результатів не зовсім ясно викладає свої висновки. Так, на стор. 73 читаємо:

«Оцінка прямої взаємодії малих ортованадатних НЧ з GSH і GSSG, показала, що пороговою концентрацією обох форм, відновленої та окисленої, що викликає агрегацію частинок в обох випадках при фізіологічних рН (рН 7,4), є 0,5 мМ. Однак при використанні більш низьких концентрацій GSH від 0,1 мМ до 0,4 мМ взаємодія НЧ з GSH відбувалося при кожній із досліджених концентрацій, що супроводжувалося збільшенням радіусу частинок і агрегацією».

Якщо пороговою концентрацією є 0,5 мМ, то це протирічить твердженню другої частини абзацу, що і за менших концентрацій відбувається агрегація. Тобто не зовсім ясно, що саме мала на увазі авторка.

3. На мою думку не зовсім чітко сформульований 4 висновок:

«Встановлено, що повний розвиток супресуючого впливу всіх типів наночастинок, за винятком CeO_{2-x} із розміром 8-10 нм, на мітохондріальний потенціал спостерігається через 24 години; даний ефект може пояснюватися взаємодією наночастинок з електрон-транспортним ланцюгом мітохондрій.»

Який саме «даний ефект»? Те, що має місце «супресуючий вплив наночастинок», чи те, що він «спостерігається через 24 години»? Якщо автор має на увазі наявність «супресуючого впливу», то так, він може бути пояснений «взаємодією наночастинок з електрон-транспортним ланцюгом мітохондрій». Якщо ж акцент на 24 годинах, то це мабуть пояснюється часом проникання наночастинок у мітохондрії, а також розвитком деяких

компенсаційних процесів у відповідь на генерацію АФК і зниження $\Delta\Psi_m$, які мають лише тимчасовий характер, на що автор указує в розділі 4.1.

4. У висновку 5 автор стверджує, що «... додавання в біотичну систему з наночастинками, що виявляють прооксидантні властивості, регуляторів окислювального балансу клітини (глутатіону та інших тіолових сполук) призводить до втрати здатності наночастинок посилювати генерацію радикалів та спричиняти зміни мітохондріального потенціалу клітини». На мою думку, справа не у «втраті здатності наночастинок посилювати генерацію радикалів», а у протидії (або компенсації) посиленої генерації регуляторами окислювального балансу клітини.

Названі зауваження не впливають на позитивну оцінку представленої дисертаційної роботи.

В дисертації, що розглядається, органічно поєднуються інформативні експериментальні методи з теоретичними підходами. Для пояснення молекулярних механізмів дії наночастинок на біологічні системи в роботі залучена теоретична кінетична модель, що описує продукцію супероксидного радикала в електрон-транспортному ланцюгу мітохондрій. Отримані результати докладно аналізуються і обговорюються із залученням відомих наразі даних наукової літератури. Робота Аверченко К.А. є цілісним закінченим дослідженням, виконаним на високому методичному рівні. Матеріали дисертаційної роботи у повному обсязі опубліковані в спеціалізованих наукових виданнях, відомих рейтингових міжнародних журналах, обговорені на наукових конференціях. За об'ємом, методичним рівнем досліджень та важливістю отриманих результатів, актуальністю, науковою новизною та практичною значимістю дисертаційна робота Аверченко Катерини Андріївни «Механізми впливу редоксактивних наночастинок ($\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ і CeO_{2-x}) на біоенергетичні процеси в мітохондріях», відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 N 567, а її авторка заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02– біофізика.

Доктор фіз.-мат. наук, проф,
в.о. зав. відділу НТК ІПКіК НАНУ
02.11. 2016 .р.

О.І. Гордієнко

Особистий архів з ф.п.п.

Засвідчено

Учений секретар інституту

3.11.2016р



Гордієнко О.І.

Гордієнко О.І.