

ВІДЗИВ

на дисертаційну роботу Вус Катерини Олександрівни «Флуоресцентне детектування амілоїдних фібрил», представленої на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Патологічна агрегація білків призводить до утворення високо упорядкованих білкових агрегатів, амілоїдних фібрил, та є одним з механізмів в етіології цілої низки так званих конформаційних хвороб, як то хвороби Альцгеймера, Паркінсона, діабету другого типу, ревматоїдного артрити, тощо. Медична діагностика нейродегенеративних та «конформаційних» захворювань на доклінічних стадіях, на яких відбувається формування та відкладання амілоїдних фібрил у різних органах та тканинах організму, полягає у реєстрації та кількісному визначенні цих агрегатів. Підвищення чутливості медичної діагностики потребує глибоких досліджень характеристик патогенних агрегатів білків, зокрема, при варіюванні факторів зовнішнього середовища. Одним із основних фізичних методів, що дає можливість провести такі дослідження на молекулярному рівні, є метод флуоресцентних зондів. У зв'язку з цим особливої **актуальності** набуває проблема тестування нових флуоресцентних зондів з покращеними спектральними властивостями, як потенційних амілоїдних маркерів, чутливих до структурно-фізичних особливостей білкових агрегатів. Пошук нових флуоресцентних зондів, що мають високу чутливість до амілоїдних фібрил і незначну до нативного білка, створює передумови для їх використання у якості амілоїдних маркерів та розширює можливості детектування їх структурних особливостей. Аналіз значень квантового виходу, констант асоціації, зсувів максимумів флуоресценції, середнього часу життя флуорофорів та ЧЗМФ вільних та зв'язаних зондів сприяє виявленню чутливості зондів до стеричних характеристик, жорсткості, полярності та до морфології амілоїдних фібрил. Отже у зв'язку з ключовою роллю, яку відіграють методи, що базуються на використанні флуоресцентних зондів у дослідженні молекулярних механізмів конформаційних хвороб, пошук нових флуоресцентних зондів із заданими характеристиками є **актуальною** задачею молекулярної біофізики.

Наукова новизна представленої дисертаційної роботи полягає в тому, що вперше отримано інформацію щодо взаємодії нових флуоресцентних зондів з амілоїдними фібрилами, виявлені перспективні потенційні амілоїдні

маркери, низки нових зондів, чутливих до в'язкості або полярності мікрооточення. На основі проведених експериментальних досліджень та квантово-хімічних розрахунків визначені характеристики зондів, як то ліпофільність, ширина молекули зонда, його заряд, що їх повинні мати амілоїдні маркери.

Практичне значення отриманих у дисертаційній роботі Вус К.О. даних забезпечується тим, що визначені параметри зв'язування флуорофорів з патогенними білковими агрегатами та квантового виходу флуоресценції, поряд з даними стосовно чутливості зондів до фізико-хімічних параметрів оточення, дозволяють детектувати амілоїдні структури, та диференціювати їх за морфологією при використанні нових барвників у медичній діагностиці, а також можуть бути використані при синтезі нових флуоресцентних маркерів з покращеними спектральними властивостями.

Огляд літератури достатньо ґрунтовний, виразно освітлює сучасний стан проблем, яких торкається дисертаційна робота. В цьому розділі детально описано структуру та біологічну роль фібрилярних агрегатів, розглянуто кінетичні аспекти фібрилізації білка, охарактеризовано основні вимоги до ефективних флуоресцентних амілоїдних маркерів та механізми взаємодії класичних зондів, тіофлавіну Т та конго червоного, з фібрилами.

У розділі «Матеріали і методи» наведено загальну характеристику матеріалів та методів дослідження. Автором дисертаційної роботи використано низку флуоресцентних методів: вимірювання спектрів флуоресценції та її інтенсивності, дослідження часороздільної флуоресценції зондів, індуктивно-резонансного переносу енергії. Автором також описано підходи до визначення квантового виходу флуоресцентних зондів, розрахунків параметрів зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами. Для характеристики досліджуваних амілоїдних фібрил використовували електронну мікроскопію, спектрофотометричний метод, визначення спектрів кругового дихроїзму, за допомогою яких отримували докази на користь фібрилізації білка. Спектрофотометричним методом визначали концентрації зондів та білків, коефіцієнти екстинкції бензантронових зондів та максимуми їх поглинання. Для додаткового підтвердження амілоїдної природи агрегатів вимірювали також диференційні спектри поглинання. Щоб довести утворення саме амілоїдних агрегатів білків під час інкубації також було проведено вимірювання інтенсивності флуоресценції тіофлавіну Т. В цьому підрозділі описані також теоретичні підходи та розрахункові моделі для визначення параметрів зв'язування зондів з амілоїдними фібрилами, квантово-хімічні розрахунки. Тобто ми бачимо в роботі фундаментальні

підходи не тільки в основній частині дослідження, а і для детальної характеристики досліджуваних зразків.

В основних розділах дисертаційної роботи Вус К.О. подані результати детальних досліджень великої низки нових зондів (бензантронів, сквараїнових зондів, похідних тіофлавіну Т). Розділ 3 присвячений дослідженню процесу зв'язування нових зондів білковими агрегатами та визначенню фізико-хімічних параметрів оточення барвників в амілоїдних фібрилах. Аналіз розрахованих параметрів зв'язування дав можливість визначити чутливість барвників до агрегатів білка, зокрема до морфології фібрил, полярності сайтів зв'язування. Показано переважний внесок гідрофобних взаємодій у стабілізацію комплексу сквараїнів з фібрилами, а також чутливість зондів G6, G7 до в'язкості оточення. Для визначення фізико-хімічних параметрів оточення бензантронів використовували аналіз червоного зсуву максимумів флуоресценції, часороздільну флуоресцентну спектроскопію та ІРПЕ. Апроксимація профілів затухання флуоресценції бензантронів показала чутливість спектральних параметрів цих флуорофорів до мікрров'язкості оточення. Показано, що бензантрони, тіофлавін Т та його похідні локалізуються в однакових жолобках фібрил.

У четвертому розділі проведено вивчення спектральних параметрів нових зондів у різних розчинниках, а також досліджено залежність чутливості флуоресцентних сполук до амілоїдних фібрил при варіюванні рН та іонної сили. З огляду на отримані дані зроблено висновок, що краща область детектування фібрил за допомогою бензантронів та сквараїнів відповідає значенням рН 7,4 та іонної сили не більше 0,15 М.

У п'ятому розділі для визначення детермінантів амілоїдної специфічності нових зондів проводили квантово-хімічні розрахунки та кореляційний аналіз. Встановлено кореляцію між експериментально визначеним відносним зростанням інтенсивності флуоресценції бензантронів у фібрилах та розрахованими квантово-хімічними дескрипторами просторової, електронної структури та міжмолекулярними дескрипторами. Показано, що потенційними амілоїдними маркерами є такі бензантрони, що мають високі значення ліпофільності, більшу ширину та вище значення суми зарядів на атомах азоту.

Таким чином, дисертаційна робота Вус Катерини Олександрівни «Флуоресцентне детектування амілоїдних фібрил» є **актуальною**, характеризується беззаперечною **науковою новизною** та має **практичне значення**, в роботі отримані важливі характеристики низки нових зондів та з використанням різних модифікацій методу флуоресцентної спектроскопії проведено комплексне фундаментальне дослідження взаємодії нових зондів

з амілоїдними фібрилами. Отримані дані дають основу для розуміння механізмів дії потенційних лікувальних засобів проти «конформаційних» захворювань.

До дисертаційної роботи є такі зауваження.

1. На мій погляд в огляді літератури забагато уваги приділяється флуорофору Конго Червоному, тоді як в експериментальній частині роботи при дослідженні нових флуорофорів вони частіше порівнюються з іншим класичним флуорофором Тіофлавіном Т. З огляду на те, що об'єм дисертаційної роботи достатньо великий, а автор для економії об'єму подає важливі експериментальні графіки у дуже зменшеному вигляді, цей підрозділ можна було б частково скоротити.

2. У підрозділі 2.2. «Об'єкти досліджень», на мій погляд, описання використання бензантронових зондів у медико-біологічних дослідженнях схоже на частину огляду літератури та є зайвим.

3. Таблиці (2.2., 2.3) та Рис. (2.5) Стор. 57 необхідно подавати після посилання у тексті, назви таблиць треба подавати так, щоб було зрозуміло з назви, які величини подані в таблиці.

4. Рис. 3.8 (стор 79), рис.3.14.(стор.94), рис. 3.19Б (стор.99), рис. 3.25 Б (стор.103) (графіки Скетчарда) – дуже дрібні графіки та забагато точок на одному графіку, при такому масштабі не видно тих ефектів, які обговорюються в тексті.

5. Рис. 4.3 (стор.140). Виникає питання, чому на рис. А – послідовність по осі y $GI \rightarrow DCM \rightarrow DMF$, а на Рис. Б послідовність $DCM \rightarrow GI \rightarrow DMF$. Якщо розмішати за спаданням (зростанням) ϵ , треба було б $GI \rightarrow DMF \rightarrow DCM$ ($DCM \rightarrow DMF \rightarrow GI$) (якщо взяти ϵ з даних на графіку 4.2). Це утруднює аналіз результатів, поданих на діаграмах. Тому важко перевірити правильність твердження, що «В цілому, максимуми флуоресценції бензантронів зростають разом із значенням діелектричної проникності ϵ »

Також на діаграмах Рис.4.10 та 4.12 (стор.148-150) різний порядок зондів на осі.

Названі зауваження не впливають на позитивну оцінку представленої дисертаційної роботи. В ній поєднуються інформативні експериментальні

методи з теоретичними підходами. Отримані результати всебічно аналізуються і обговорюються із залученням відомих наразі даних. Робота представляє собою цілісне закінчене дослідження, проведене на високому методичному рівні. Матеріали дисертаційної роботи у повному обсязі опубліковані в спеціалізованих наукових виданнях, відомих рейтингових міжнародних журналах. За об'ємом, методичним рівнем досліджень та важливістю отриманих результатів, актуальністю, науковою новизною та практичною значимістю дисертаційна робота Вус Катерини Олександрівни «Флуоресцентне детектування амілоїдних фібрил» відповідає вимогам до кандидатських дисертацій а її авторка заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02–біофізика.

Доктор фіз.-мат. наук, проф



О.І. Гордієнко

