

ВІДЗИВ
офіційного опонента
на дисертацію ТРУСОВОЇ Валерії Михайлівни
«Білок-ліпідні взаємодії як модулятор агрегаційної поведінки білків»,
представлену на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук
зі спеціальності 03.00.02 – біофізика

Дисертація В.М.Трусової присвячена дослідженню молекулярних механізмів агрегації макромолекул білків в реальних середовищах біологічних тканин, зокрема, клітинних мембран. Прикладом мембранно-опосередкованої агрегації білків є утворення високопорядкованих фібрилярних структур (так званих амілоїдів). Акумуляція таких білкових агрегатів розглядається як один з факторів патогенезу так званих «конформаційних захворювань» типу хвороб Альцгеймера та Паркінсона, і серед найсучасніших методів боротьби з цими захворюваннями в світовій літературі широко розглядають способи протидії утворенню таких «амілоїдних бляшок». При цьому важливим моментом є дослідження кореляції між молекулярними трансформаціями білків і пептидів та фізико-хімічними властивостями ліпідного бішару клітинної мембрани. Процес агрегації білків в мембранних системах, зокрема, фосфоліпідних, стає, таким чином, природним об'єктом біофізичного дослідження, яке і стало основним напрямком робіт в рецензованій дисертації. Тут важливо відзначити, що саме «фосфоліпідно-мембранні» аспекти з різних суб'єктивних причин здебільшого залишаються на периферії уваги світового фронту досліджень. Тому безумовними є як актуальність та важливість роботи В.М.Трусової, так і її відповідність спеціальності «біофізика» за об'єктами, підходами та методами дослідження, причому це стосується як фундаментальних аспектів молекулярної біофізики, так і потенційних практичних медико-біологічних застосувань.

В першому розділі дисертації надано вельми детальний огляд літератури з білок-ліпідних взаємодій та їх ролі у визначенні агрегаційної поведінки білкових молекул. Дано чітку систематизацію факторів, які можуть впливати на фібрилогенез у мембранних системах, та окреслено коло невирішених, не вповні з'ясованих та дискусійних питань, на основі чого обгрунтовано і сформульовано мету та задачі роботи.

Другий розділ присвячено опису використаних в роботі речовин і систем та методів їх експериментальних досліджень. Білкові молекули представлені лізоцимом, цитохромом *c* та аполіпопротеїнами різного ступеню олігомеризації. Модельні фосфоліпідні мембрани як впорядковані середовища використано у вигляді ліпідних бішарів, моношарів, а також ліпосом. Позитивним моментом роботи є дуже широке розмаїття хімічного складу фосфоліпідів – тут і цвіттерійні, і аніонні, представники фосфатидилхолінів, фосфатидилгліцеринів, фосфатидилсеринів, кардіоліпінів, а також стероїд холестерин, вплив якого на фазовий стан та властивості фосфоліпідних мембран продовжує бути в центрі уваги досліджень з біофізики мембран. Треба відзначити також використання широкого кола флуоресцентних зондів, які для кожного конкретного експерименту було ретельно підібрано для досягнення максимальної адекватності спостережуваного люмінесцентного відгуку особливостям молекулярної та надмолекулярної структури тестованих цими зондами мембран. В роботі використано цілу низку найсучасніших методів досліджень флуоресценції (за допомогою відповідних приладів) – стаціонарних, часороздільних, вимірювання індуктивно-резонансного переносу енергії, флуоресцентна мікроскопія тощо. Люмінесцентні дослідження доповнювались електронною та атомно-силовою мікроскопією. Необхідні реверанси також зроблено і в бік теоретичних методів типу молекулярної динаміки.

В третьому розділі розвинуто нові підходи до аналізу агрегаційних властивостей білків у водному та ліпідному оточенні. Серед найважливіших результатів треба відзначити детальний аналіз застосовності нового флуоресцентного зонду – бензантронового флуорофору АБМ – для ідентифікації та структурного аналізу амілоїдних фібрил та визначення низки його переваг в порівнянні з відомими маркерами. Розроблено нову методологію визначення ступеню олігомеризації білків у мембранній матриці на основі сукупності даних стаціонарних і часороздільних вимірювань і показано, зокрема, принципову відмінність випадків нейтральних та аніонних ліпідів. Відзначено можливість певного синергізму процесів структурної трансформації фосфоліпідного бішару та агрегації лізоциму, що є новим і цікавим аспектом розвитку загальних уявлень про картину ліпід-білкових взаємодій.

Четвертий розділ присвячено аналізу мембранних ефектів префібрілярних олігомерів лізоциму, цитохрому *c* та аполіпопротеїну А-I з різними кінцевими фрагментами. Тут було використано класичні мембранні зонди пірену та дифенілгексатрієну. Детально досліджено особливості, викликані варіюванням складу фосфоліпідного бішару шляхом внесення до базового фосфатидилхоліну інших компонентів – фосфатидилгліцерину, кардіоліпину, холестерину, і зроблено висновки

щодо впорядкування вуглеводневих ланцюгів ліпідів при зв'язуванні префібрилярних агрегатів лізоциму з ліпідними мембранами. Щодо впливу олігомерного лізоциму на полярну частину фосфоліпідного бішару, тут оптимальними виявились інші зонди – Продан та диметиламінохалкон, оскільки тут вирішальну роль відіграє дегідратація полярної області при зв'язуванні олігомерів лізоциму. Цікавими також є особливості взаємодії цитохрому *c* з мішаними везикулами, які склались із сумішей фосфатидилхоліну з кардіоліпіном. Тут було використано метод індуктивно-резонансного переносу енергії з використанням антрілвінільних флуорофорів, ковалентно приєднаних до молекул фосфоліпідів, як донорів енергії. Цей метод дав можливість виявити низку цікавих ефектів, які дали інформацію про особливості структури на молекулярному рівні – стабілізація комплексів цитохрому *c* з ліпідами завдяки як електростатичним, так і гідрофобним взаємодіям, можливість акумуляції аніонних ліпідів навколо зв'язаного білка, зростання поверхневої концентрації сорбованого білка при зниженні концентрації ліпиду тощо.

В п'ятому розділі привертає значну увагу вже сама його назва – «Амілоїдні фібрили як особливий клас мембранотропних агентів». Фактично ми маємо віднайдення досить нетривіальних зв'язків і аналогій між двома різними широко відомими напрямками, які звичайно розглядаються під назвами «ліпід-білкові взаємодії» та «drug-membrane interactions». Тут, окрім фосфоліпідних бішарів, розглянуто також ленгмюрівські моношари тих самих мішаних фосфоліпідних систем, в яких також досліджено вплив фібрилярних агрегатів на структурні аспекти. Щодо бішарів, тут треба відзначити цікаву інформацію про можливість конкурентної взаємодії амілоїдних фібрил та периферичних мембранних білків з ліпідним бішаром.

Логічним продовженням і певним завершенням концептуального підходу дисертації виглядає її шостий розділ, в якому реалізовано перехід від «мембранотропних» ефектів до безпосереднього розгляду структурних модифікацій фібрилярних агрегатів білків в умовах взаємодії з фосфоліпідною матрицею. Тут фактично запропоновано нову стратегію дослідження топологічних модифікацій фібрилярних агрегатів. Зокрема, висунуто концепцію мембранно-опосередкованого структурного переходу певних типів амілоїдних фібрил із конфігурацій закрученої або спіральної стрічки до планарної конфігурації. При адсорбції фібрилярного фрагмента на поверхні ліпідного бішару може відбуватися реаранжування мережі водневих зв'язків білкових агрегатів, що призводить до їх відповідної структурної трансформації в ліпідному середовищі.

Нарешті, сьомий розділ присвячено моделюванню та аналізу на основі комп'ютерних розрахунків різних аспектів ліпід-опосередкованої агрегації білків. Тут

можна відзначити чисельне моделювання процесу електростатично контрольованої адсорбції білків на поверхні мембран в залежності від низки параметрів – концентрації білка та ліпідів, ступеню олігомеризації та заряду білка, частка аніонних та нейтральних фосфоліпідів у бішарі, рН середовища тощо. Отримано ізотерми адсорбції для різних співвідношень параметрів. З використанням різних розрахункових алгоритмів було сформульовано умови потенційної «агрегаційності» амілоїдогенних фрагментів лізоциму, цитохрому *c* та аполіпопротеїну. Методом молекулярної динаміки отримано наочні картини конформаційних змін білкових молекул під впливом ліпідної матриці.

Характеризуючи загальне враження від дисертації, треба відзначити поєднання в ній, з одного боку, дуже великого обсягу наведених результатів, отриманих великою кількістю різноманітних методів, а з іншого – чіткого визначення складу досліджених систем з варіюванням комбінацій обмеженої кількості білків з логічно підібраними фосфоліпідами певної хімічної будови. В сукупності з модельними розрахунками для тих самих систем це повністю виключає сумніви в достовірності отриманих результатів та обґрунтованості зроблених висновків. Виклад роботи добре ілюстровано численними рисунками, які дають чітке наочне уявлення про надмолекулярну структуру досліджуваних ліпід-білкових систем. Безсумнівною є і наукова новизна основних результатів роботи, які опубліковано у більш ніж 20 статтях в міжнародних фахових журналах з високим рейтингом. Особливо хотілося б відзначити велику за обсягом одноосібну публікацію авторки в Cellular and Molecular Biology Letters (публікація [21] за авторефератом), яку, на мою думку, можна вважати зразком чіткого викладу проблематики дисертаційної роботи. Апробація на численних міжнародних конференціях засвідчила значний інтерес світової наукової спільноти до цієї роботи та високу оцінку як отриманих результатів, так і високої кваліфікації В.М.Трусової як визнаного вченого-біофізика.

Певна річ, що така цікава і непересічна робота викликає багато питань та створює приводи для низки зауважень.

1. В розділі 3.2.1 згадується *N*-(1-пірен)малеїнімід як флуоресцентний зонд, а далі мова йде виключно про пірен, що люмінесцює лише в стекінговій формі. Бажано б навести пояснення та схематичний рисунок – де пірен, а де *N*-(1-пірен)малеїнімід.

2. В розділі 4.1.2 згадується ДМХ. Можна здогадатися, що це диметилхалкон, але в переліку умовних позначень він відсутній.

3. При розгляді молекулярних моделей трапляються вирази типу «полярні головки аніонних ліпідів, які взаємодіють з позитивно зарядженими амінокислотними залишками

білків». Тут бажано було б для більшої наочності також навести структурні хімічні формули молекулярних фрагментів, що взаємодіють.

4. У вступній частині вказано, що утворення амілоїдних фібрил та інші зміни конформацій білків дуже чутливі до дії великої кількості факторів. З огляду на можливість ковалентного зв'язування флуоресцентних міток з лізоцимом та ін. та необхідності для молекул міток бути досить близько одна до одної для реалізації індуктивно-резонансного переходу, концентрація міток повинна бути достатньо високою, що може вплинути на процес утворення фібрил. Бажано було б паралельно використати якийсь інший (неінвазивний) метод, наприклад, диференціальну скануючу калориметрію (ДСК).

5. Використання ДСК могло б бути дуже корисним для аналізу гіпотетичних структур, наведених на рис.3.26. Без сумніву, на ДСК-термограмах для ряду систем ФХ-КЛ15-КЛ25 було б чітко видно істотні відмінності.

6. В розділі 4.3, де розглядається взаємодія цитохрому *c* з ліпідним бішаром, дано аналіз низки гіпотетичних моделей, який займає більше 15 сторінок дисертації. Цей вельми розлогий виклад підсумовано всього п'ятьма рядками висновку 3 до розділу 4 (с.194), де вказано лише два досить очевидних чинники, що виглядає дещо дивним.

7. В продовження цього, виклад і багатьох інших розділів виглядає занадто розтягнутим і деталізованим. Загальний об'єм дисертації можна було б без істотних втрат змісту скоротити – з 391 сторінки принаймні до трьохсот.

Ці зауваження жодним чином не знижують загальну високу оцінку роботи. Окрім наукового значення для біофізики та суміжних галузей, результати дисертації В.М.Трусової мають і безумовне практичне значення. Встановлені в роботі обґрунтовані уявлення про взаємовплив процесів структурної реорганізації фібрилоутворюючих білків та фосфоліпідних мембран становлять надійну наукову базу для розробки методів боротьби з «амілоїдними бляшками» для профілактики та лікування низки тяжких захворювань. Отримані в роботі дані з люмінесцентних властивостей нових зондів у біологічних середовищах будуть корисними для використання цих зондів в інших медико-біологічних дослідженнях. Можна рекомендувати використання результатів дисертації в Інституті сцинтиляційних матеріалів НТК «Інститут монокристалів» НАНУ, а також на кафедрі біофізики і кафедрі ядерної та медичної фізики Харківського національного університету ім.В.Н.Каразіна

Дисертація чітко викладена державною мовою, зауваження до оформлення практично відсутні.

Дисертація В.М.Трусової, подана на здобуття наукового ступеня доктора 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 – встановлення ролі білок-ліпідних взаємодій в процесах патологічної агрегації білків. Всі основні результати та висновки роботи належним чином опубліковані та пройшли апробацію. Результати, за якими було захищено кандидатську дисертацію, не входять до представленої дисертаційної роботи. Автореферат повністю відповідає змісту дисертації.

За обсягом проведених досліджень, актуальністю, ступенем обґрунтованості наукових положень і висновків, їх новизною та достовірністю, повнотою викладення, значимістю для науки, дисертація В.М.Трусової «Білок-ліпідні взаємодії як модулятор агрегаційної поведінки білків» 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 докторських дисертацій, а її авторка - Трусова Валерія Михайлівна - безумовно, заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Офіційний опонент

доктор фізико-математичних наук,
професор,
провідний науковий співробітник
відділу молекулярних і гетероструктурованих
матеріалів Інституту сцинтиляційних
матеріалів НАН України

Л.М.Лисецький

Підпис Л.М.Лисецького засвідчую:

Вчений секретар ІСМА НАН України
к.т.н.



Ю.М.Дацько