

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Баранник Мар'яни Олександрівни
«Вплив фізико-хімічних чинників середовища на міжклітинну адгезію
лактобактерій *Streptococcus thermophilus* та еритроцитів людини»,
подану на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук
за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Останніми десятиріччями все більше уваги приділяється проблемі вивчення клітинної адгезії, яка належить до початкового етапу клітинної взаємодії та є невід'ємною частиною функціонування живих організмів. Зокрема, мікробна адгезія до тканин та клітин, за сучасними уявленнями, відіграє ключову роль у перебігу інфекційних та деяких інших захворювань. Отже, за наявної потреби у детальному вивченні цих процесів з метою застосування для вирішення важливих медико-біологічних задач, невпинно зростає кількість наукових робіт з цього напрямку, виникають різноманітні методики вивчення мікробної адгезії.

Дисертаційна робота М. О. Баранник присвячена вивченню ролі фізико-хімічних чинників в процесі адгезії лактобактерій на еритроцитах. Еритроцити вважають універсальною моделлю для дослідження бактеріальної адгезії внаслідок встановлення подібності адгезивних молекул на їх поверхні та на глікокаліксі епітеліальних тканин; до того ж, кількість еритроцитів у крові на два порядки перевищує кількість лейкоцитів, тож, вірогідність їх контакту із клітинами бактерій має бути суттєвою. Мікробній адгезії на еритроцитах присвячена низка сучасних робіт медико-біологічного напрямку. На користь того, що бактеріальні контакти із еритроцитами є суттєвими для живих організмів, свідчить й той факт, що у чутливих до даного мікроорганізму видів відповідна адгезійна здатність еритроцитів значно перевищує таку у малочутливих (Оборін, 2011).

У дисертаційній роботі М. О. Баранник запропонований біофізичний підхід до вказаної проблеми, в рамках якого розглянуто фізичні процеси, що обумовлюють клітинну адгезію, та виокремлено роль електростатичних сил. Крім того, дуже корисно з практичної точки зору, що кожний параметр середовища (рН, іонна сила, концентрація двовалентних іонів) розглянутий в роботі як окремий чинник, причому перші два – у діапазоні поблизу фізіологічних значень.

В дисертаційній роботі М. О. Баранник запропоновано методику визначення показника бактеріальної адгезії як середньої кількості адгезованих на еритроциті бактерій за допомогою оптичного мікроскопу. На відміну від традиційних методик оцінки адгезії (зокрема, методу В. І. Бріліс, методу С. С. Гізатуліної), а також деяких новітніх (метод В. А. Оборіна), дана методика дозволяє встановити показник адгезії для тих мікроорганізмів, які зв'язалися з еритроцитами необоротно. Методика отримання показника адгезії, використана в дисертації Баранник М. О., має дещо більшу експериментальну похибку вимірювань за вищезазначені методи, втім, дозволяє достовірно оцінювати зміни показника адгезії під впливом різноманітних чинників.

Запропонований в дисертаційній роботі М. О. Баранник підхід до вивчення клітинної адгезії дозволив авторці отримати низку нових цікавих результатів. Слід особливо відмітити деякі з них.

- Отримано немонотонну залежність показника адгезії від рН із максимумом за його фізіологічного значення для еритроцитів.
- Дуже вдало та плідно застосований підхід до міжклітинної взаємодії з точки зору взаємодії заряджених поверхонь в рамках розширеної теорії Дерягіна – Ландау – Фервея – Овербека. Так, авторці вдалося показати, що збільшення іонної сили середовища призводить до підвищення адгезії завдяки впливу на її оборотну стадію, тоді як присутність іонів кальцію та магнію може впливати як на оборотну, так і на необоротну стадії адгезії.
- Показано, що іони кальцію та магнію неоднаково впливають на поверхневий заряд клітин: перші зменшують поверхневий заряд еритроцитів, другі – лактобактерій *S. thermophilus*.
- Показано високий ступінь лінійної кореляції із показником адгезії таких розрахованих параметрів як дебаївський радіус, поверхневий потенціал еритроцитів та імовірність утворення специфічного зв'язку.
- Запропоновано величину поверхневого потенціалу як параметра, що характеризує функціональну здатність клітин, що безумовно, є більш адекватним маркером, ніж кількість неушкоджених клітин.

З метою поліпшення застосовності результатів для процесів, що відбуваються в живих організмах, перспективним здається проведення досліджень у середях із вмістом препаратів сироватки крові, оскільки на адгезивну актив-

ність клітин великий вплив мають компоненти плазми, зокрема білки (альбуміни, імуноглобуліни, тощо).

Дисертаційна робота М. О. Баранник складається зі вступу, 5 розділів та висновків. У **вступі** обґрунтована актуальність обраної для дослідження проблеми, наведені мета й задачі дослідження, сформульована наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення, вказані особистий внесок здобувача, публікації за темою дисертації, тощо.

У **розділі 1** поданий глибокий аналітичний огляд наукової літератури з напрямку клітинної адгезії. Розглянуті фізичні механізми адгезії, визначальні сили адгезії та їх відносний внесок; детально розглянуті електростатичні та структурні (сольватаційні) сили як найбільш значущі для процесу клітинної адгезії. Обґрунтовано використання розширеної теорії колоїдної стабільності Дерягіна – Ландау – Фервея – Овербека (ДЛФО), яка враховує як електростатичні, так і сольватаційні сили, для вивчення процесів мікробної адгезії на еритроцитах. Охарактеризовано стадії, молекулярні механізми та види клітинної адгезії, а також структурні особливості еритроцитів людини та *S. thermophilus*, важливі для їх адгезійної здатності.

У **розділі 2** охарактеризовано матеріали, що використовувалися у дослідженні (препарати еритроцитів людини та лактобактерій *S. thermophilus*, буферні розчини, кріоконсерванти, тощо), техніку експеримента, наведено методику статистичної обробки результатів досліджень, теоретичні розрахунки. Фізичні методи дослідження, застосовані в роботі, – мікроскопія та спектрофотометрія. Викладено методику визначення показника адгезії за допомогою мікроскопії; описано методику визначення поверхневого заряду лактобактерій та еритроцитів за допомогою барвника альціанового синього, методики дослідження впливу параметрів середовища на клітинну адгезію, а також використані режими кріоконсервування.

У **розділі 3** досліджений вплив величини рН, іонної сили та концентрації іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} на адгезію *S. thermophilus* на еритроцитах людини. Зокрема, встановлено, що показник адгезії є максимальним за фізіологічного для еритроцитів значення рН; розглянуто низку можливих механізмів впливу рН на клітинну адгезію. Наведені результати щодо впливу іонної сили середовища в діапазоні поблизу її фізіологічних значень, які свідчать про підвищення показника адгезії із підвищенням іонної сили, що пояснено за допомогою теорії ДЛФО. Особливо розглянута суперпозиція структурних та електростатичних сил за різних значень іонної сили та відстані між клітинними

поверхнями, а також значення складу клітинної поверхні та її гідрофобності, з наведенням прикладів з літератури. Встановлено вірогідне зменшення показника адгезії при концентрації іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} 0,01 %, яка відповідає 2,5 мМ для Ca^{2+} (фізіологічна концентрація у сироватці крові) та 4 мМ для Mg^{2+} (вчетверо перебільшує фізіологічну концентрацію). Виходячи з того, що у подібному оточенні адгезія клітин повинна зростати завдяки зменшенню електростатичного та структурного компонентів відштовхування, зроблено висновок, що означені катіони впливають не на першу, а на другу стадію адгезії. Розглянуті деякі можливі молекулярні механізми такого впливу.

У розділі 4 наведені результати щодо стану поверхневого заряду досліджуваних клітин як важливого чинника клітинної адгезії, який оцінювали по кількості зв'язаного барвника альціанового синього. Встановлено, що поверхневий заряд суттєво не залежить від рН та іонної сили середовища, проте змінюється у присутності іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} . Встановлено, що іони Ca^{2+} в концентраціях, близьких до фізіологічних, впливають на поверхневий заряд еритроцитів, дещо знижуючи його, тоді як іони Mg^{2+} у концентрації до 0,04 % (~ 17 мМ) знижують поверхневий заряд *S. thermophilus*. Обговорено можливі причини різного впливу цих катіонів. На основі рівняння Грема розраховано дебаївські радіуси та поверхневі потенціали еритроцитів, а також концентрації протиіонів біля поверхні еритроцитів у розчинах NaCl та NaCl – CaCl_2 . Показано, що зі зміною концентрацій розчинів найбільших змін зазнає концентрація Ca^{2+} на поверхні еритроцита. За допомогою теорії ДЛФО розраховано значення імовірності утворення специфічного адгезійного зв'язку у розчині NaCl – CaCl_2 , яке знижується майже вдвічі при зростанні концентрації CaCl_2 від 0 до 3,6 мМ. Показано високий ступінь лінійної кореляції розрахованих параметрів із показником адгезії. Зроблено висновок про визначальну роль електростатичних взаємодій у встановленні специфічного адгезійного зв'язку.

У розділі 5 проведено дослідження впливу режиму кріоконсервування на процес клітинної адгезії еритроцитів та *S. thermophilus*. Протестовано три режими кріоконсервування еритроцитів людини: під захистом поліетиленоксиду (ПЕО-1500), гліцерину та 1,2-пропандіолу. Наведені характеристики та літературні дані для кожного з режимів. Встановлено, що після заморожування – відтаювання еритроцити розрізняються за показником адгезії *S. thermophilus*, станом поверхневого заряду, а також відносною втратою клітин. Показано, що за усіма цими параметрами найменш ушкоджуючим є

кріоконсервування під захистом ПЕО-1500. Зроблено висновок щодо доцільності оцінювання якості клітин за показником адгезії та станом поверхневого заряду.

Втім, при загальній позитивній оцінці роботи, слід зробити наступні зауваження:

1. В роботі відсутнє обґрунтування вибору видів клітин для проведених модельних досліджень. Доцільно було б вказати, який саме був набір бактерій при тестуванні та за якими показниками авторка відібрала для досліджень саме лактобактерії *S. thermophilus*.
2. Доцільно було б охарактеризувати методики вивчення клітинної адгезії, наявні на теперішній час, висвітлити переваги та недоліки запропонованої методики, а також окреслити можливі межі її застосування.
3. Звертає на себе увагу досить високий рівень експериментальної похибки. В такому разі слід було б вказати можливі причини похибки, а також провести порівняння із літературними даними щодо цієї величини, визначеної за іншими методиками.
4. На рис. 3 автореферату (рис. 4.1 та 4.2 дисертації) концентрації іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} подані у масових одиницях, тоді як на рис. 4 автореферату (рис. 4.5 дисертації) вони представлені у мольних одиницях, що дуже ускладнює співставлення даних. Оскільки у тексті йдеться про фізіологічну концентрацію іонів Ca^{2+} , варто було б щонайменш вказати її значення у масових одиницях.
5. Скрізь в авторефераті та тексті дисертації застосовуються терміни «коефіцієнт кореляції» та «кореляція», але жодного разу не пояснюється, що мається на увазі коефіцієнт лінійної кореляції, обчислений за формулою Пірсона. Це ніяк не відзначено навіть при наведенні самої цієї формули (с. 49 дисертації).
6. Треба відмітити декотру неувважність у застосуванні умовних позначень та аббревіатури в тексті дисертації. Так, наприклад, аббревіатури ККК (критична константа коагуляції) та ЛПС (ліпополісахариди) уведені на с. 22 та с. 54, відповідно, але більше в тексті не використовуються; аббревіатурою АСМ позначені водночас й атомно-силовий мікроскоп, й метод атомно-силової мікроскопії (с. 53); подвійний електричний шар позначений аббревіатурою EDL (с. 19), при цьому оригінальний термін, від якого саме й утворена аббревіатура, не наведений, те ж стосується і аббревіатури SLP (с. 62); зустрічається різне позначення заряду іонів, наприклад, Ca^{++} , Ca^{2+} і

навіть Ca^2 . Перелік умовних позначень складений в порядку їх розташування в тексті, а не в алфавітному порядку, що досить ускладнює користування ним.

Проте, зазначені зауваження ніяк не впливають на загальну високу оцінку дисертації.

Результати, представлені в дисертації, у повному обсязі викладені у 7 публікаціях у фахових виданнях, а також у 16 тезах доповідей на наукових конференціях. Представлені здобувачем результати є новими та оригінальними, а сформульовані у дисертації висновки – науково обґрунтованими.

Дисертаційна робота «Вплив фізико-хімічних чинників середовища на міжклітинну адгезію лактобактерій *Streptococcus thermophilus* та еритроцитів людини» є завершеною науковою працею, в якій запропоновані оригінальні підходи до вивчення явища клітинної адгезії, а також отримані нові науково обґрунтовані результати. Робота відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», а її авторка, Баранник Мар'яна Олександрівна, заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

старший науковий співробітник

відділу молекулярних і гетероструктурованих матеріалів

Інституту сцинтиляційних матеріалів НАНУ,

кандидат фіз.-мат. наук, с.н.с.

Ващенко О.В.

Справжність підпису О.В. Ващенко підтверджую:

Вчений секретар

Інституту сцинтиляційних матеріалів НАНУ

кандидат техн. наук



Дацько Ю.М.

07.07.2016 р.