

ВІДГУК

офіційного опонента про дисертацію

Гнатюк Олени Петрівни

**«Спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико – математичні науки)**

Тема дисертаційної роботи Гнатюк Олени Петрівни полягає в використанні спектроскопічних методів для вивчення взаємодії біологічних систем з наночастинками та наноструктурами. Вона має три тісно пов'язані аспекти, що є послідовним розвитком даного підходу до все складніших біофізичних задач. Це (i) спектроскопічне дослідження особливостей взаємодії біологічних молекул (білків, ліпідів, основ ДНК), культур клітин та зрізів біологічних тканин з наноструктурами різної природи (двовимірними наночастинками сульфиду вольфраму та нітриду бору, наночастинками графену та оксиду графену, вуглецевими нанотрубками, фулеренами), (ii) використання спектроскопічних методів як інструменту вивчення впливу наночастинок (зокрема, сульфиду вольфраму) на дію протипухлинних препаратів (оксалиплатину, карбоплатину та доксорубіцину) та (iii) знаходження спектроскопічних маркерів для аналізу вторинної структури колагену у складі біологічних тканини (Ахіллового сухожилля та твердої мозкової оболонки) з метою контролю ефективності терапевтичних методів. Такою темою і визначені **об'єкт і предмети дослідження**, відповідно. **Метою** роботи є встановлення спектроскопічних маркерів зазначених взаємодій, визначення особливостей цих маркерів та механізмів взаємодії низки одно- та двовимірних наноструктур на конформаційні властивості біологічних молекул та морфологічні і функціональні властивості культур клітин (фібробластів, деяких пухлинних клітин, колагену та ін.). **Актуальність** даної роботи зумовлена тим, що досліджувані системи надзвичайно важливі з огляду на їх роль в нашому розумінні біологічних процесів за присутності наночастинок, що останнім часом широко використовуються як носії певних медичних препаратів до місця призначення, та як можливість їх використання в якості контролю процесу лікування онкологічних захворювань протипухлинними препаратами та процесів загоювання ран різної природи. Крім того, можливість встановлення вторинної структури білків колагену та лізоциму надзвичайно важлива з огляду на їх актуальність для пошуку та вивчення ефективності методів

інгібування формування амілоїдних фібрил лізоциму, що призводять до патогенезу хвороб Альцгеймера, системного амілоїдозу, тощо.

Зазначена робота є чітко визначеним **цілісним міждисциплінарним дослідженням**, що охоплює фізичні, біологічні та медичні аспекти. В роботі встановлені спектроскопічні маркери взаємодій біологічних систем з наноструктурами, розроблені специфічні підходи для аналізу отриманої спектральної інформації кожної досліджуваної системи, проведено систематизацію та узагальнення отриманих спектральних даних. **Основним експериментальним методом** в даній роботі є коливальна спектроскопія - це класична інфрачервона- (так звана FTIR), Раман- спектроскопія та когерентна антистоксова Раман-спектроскопія (CARS). Остання базується на процесі вимушеного Раманівського розсіювання, коли молекулярні коливання фазуються зовнішнім випромінюванням і розсіюються в антистоксову область, причому рівень сигналу в CARS може бути на **4-5 порядків вищий** ніж в Раманівській спектроскопії, що дозволяє візуалізувати досліджувані об'єкти на характерних коливальних частотах. Суттєвою перевагою Раман спектроскопій є можливість реєструвати сигнали від живих клітин у фізіологічних умовах через слабкий сигнал води, що завжди присутня в біологічних тканинах. **Унікальність** даних, отриманих методом коливальної спектроскопії, полягає в тому, що вони дають можливість на молекулярному рівні провести конформаційний аналіз як окремих молекул, так і у складі клітин та тканин, що є **актуальним для фундаментальних та прикладних задач** фізики, біології та медицини. Тому розширення бази даних спектральних маркерів може бути основою для подальшого застосування методу інфрачервоної спектроскопії для прикладних задач біології, біохімії, а також діагностичних задач медицини.

Поза сумніву актуальним є і вибір досліджуваних наночастинок, зокрема новітніх 2D матеріалів на основі сульфіду вольфраму та нітриду бору. Особливо важливою властивістю даних матеріалів з точки зору можливості їх застосувань в біології і медицині є суттєво нижча токсичність порівняно з широко досліджуваними раніше вуглецевими матеріалами, що відкриває перспективи створення на їх основі ефективних і нетоксичних систем доставки ліків. Це свідчить про **новизну отриманих автором результатів** не лише на час написання робіт, а і їх **актуальність** на теперішній час, особливо враховуючи можливість їх практичного застосування на фоні зростаючих можливостей використання сучасних нанотехнологій в фізиці та медицині.

На **актуальність** обраної автором тематики вказує і зв'язок роботи з дослідженнями, виконаними в межах державних бюджетних тем Міністерства освіти і науки України та НДР Інституту фізики Національної академії наук України, в якому виконано роботу. Серед них

“Дослідження фізичних властивостей і структурної динаміки біологічних макромолекул та нанокомплексів на їх основі” (2008-2012 рр., 1.4.В/150), “Дослідження структурних та динамічних властивостей природних та штучних наносистем, що містять біологічні макромолекули та їх комплекси” (2013-2017 рр., 1.4.В/173), “Фізичні ефекти та механізми взаємодії біологічних молекул та надмолекулярних біологічних систем з наночастинками та наноструктурованими середовищами” (2018-2022 рр., 1.4.В/196). Окрім того, Гнатюк О.П. була відповідальним виконавцем в міжнародних проектах за програмою Горизонт-2020 “Вплив асиметрії та кривизни клітинної мембрани на функціонування мембранних білків та транспорт терапевтичних препаратів”, H2020-MSCA-RISE-2015, 690853 — assymcurv H2020-MSCA-RISE-2015 2016-2019, НАТО - “Новий метод детектування біозабруднень” NATO SPS G5291 2017-2019, та ряді двосторонніх проектів.

Достовірність отриманих в роботі результатів забезпечена узгодженням експериментальних результатів з теоретичними розрахунками, зокрема, з даними квантово-механічного моделювання методом теорії функціоналу густини, а також узгодженням результатів, отриманих автором різними експериментальними методами. В роботі використано сучасне експериментальне обладнання відомих виробників, зокрема ІЧ спектрометри фірми Bruker (Німеччина) IFS-66 та INVENIO-R, конфокальної мікроскоп Carl Zeiss, а також спеціальне програмне забезпечення для обробки спектрів.

Результати роботи пройшли міжнародну **апробацію**, вони доповідалися на численних міжнародних конференціях з фізики, матеріалознавства, біології та медицини.

Дисертація є сукупністю наукових статей за науковою тематикою із детальним аналізом **сучасного** стану досліджуваних проблем та знайдених рішень за сукупністю експериментальних та розрахункових методик. **За структурою дисертація складається** зі Вступу, п’яти розділів, Висновків, Списку використаних джерел та Додатку, що містить публікації за темою дисертації (разом 52, в тому числі 19 статей у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України та у наукових періодичних закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus (з них 11 робіт у виданнях, що входять до перших двох квіртилів (Q1/Q2) за класифікацією SCImago Journal and Country Rank), 2 розділи у колективних монографіях та в 31 роботі, що видані за матеріалами конференцій). Загальний обсяг становить 275 сторінок. Дисертація добре ілюстрована і містить список використаних позначень. Висновки та список використаних джерел даються для кожного розділу, а на завершення наводяться загальні висновки. В роботі чітко визначено **особистий внесок здобувача**.

У **Вступі** чітко описано актуальність досліджень даної роботи, сформульовано мету та задачі, поставлені в роботі, визначено новизну та практичну цінність отриманих результатів,

зазначено особистий внесок здобувача у кожен роботу, що винесена на захист, вказано відповідність з науково-дослідними роботами відділу. Також у Вступі коротко охарактеризовано зміст кожного розділу, що є необхідною умовою для дисертацій, що захищаються за сукупністю наукових робіт.

Перший розділ містить аналіз спектральних маркерів взаємодії наночастинок нітриду бору та дисульфиду вольфраму з культурами клітин та конформаційних переходів в лізоцимі - ферменті, який руйнує стінки бактерій. Особливо важливими і актуальними результатами в цьому розділі, окрім зазначеного вище, є показана можливість використання наночастинок для **підсилення оптичних сигналів** в спектроскопії та мікроскопії, що особливо актуальну для біофізичних систем. За допомогою наночастинок нітриду бору вдалося отримати Раманівські спектри компонент клітини (ядра, цитоплазми, мембрани), що з одного боку свідчить про різні місця локалізації наночастинок в клітині, а з іншого відкриває перспективи використання такого типу наночастинок для задач біології та медицини. Також в першому розділі наведені спектральні маркери впливу наночастинок дисульфиду вольфраму на конформацію лізоциму та утворення амілоїдних фібрил. Проведено детальний компонентний аналіз смуги Амід I лізоциму та показано, що при утворенні фібрил зростає вклад бета-структури, а вклад неупорядкованої фази та альфа-спіралі зменшується. Показано також, що в залежності від рН середовища та концентрації вихідних речовин наночастинки можуть чинити двоякий вплив – або сприяти утворенню фібрил, або навпаки перешкоджати цьому.

У **Другому розділі** наведено результати дослідження спектральних маркерів взаємодії різного типу вуглецевих наночастинок (графену, оксиду графену, нанотрубок, молекул фулерену) з біологічними молекулами. Показано, що наночастинки графену та оксиду графену можуть бути використані для підсилення оптичних сигналів в ІЧ спектрах біологічних молекул, зокрема основ ДНК тиміну та аденіну. Найбільше підсилення порядку 10 раз вдалося отримати для молекул аденіну за присутності наночастинок оксиду графену. Механізми такого підсилення можуть мати різну природу – для графену більш характерне підсилення локального електромагнітного поля, а для оксиду графену вклад у підсилення дають процеси переносу заряду. Також в другому розділі проаналізовано спектральні маркери впливу вуглецевих нанотрубок на конформаційні переходи в лізоцимі та утворення амілоїдних фібрил. Проведено розклад спектру на компоненти смуги Амід I та визначено вклад антипаралельної бета- конформації лізоциму. Крім того, розглянуто можливості використання наноструктурованої позолоченої поверхні для дослідження культур клітин в спектроскопії та конфокальній мікроскопії. На сьогодні застосування такого типу підложок є усталеною практикою і широко застосовується в спектроскопії та мікроскопії.

У **Третньому розділі** проаналізовано спектральні маркери вуглецевих наноструктур, серед яких сажа, вуглецеві одно- та багато-стінні нанотрубки, графен. Визначено спектральні ІЧ та раман маркери, а також показано, як за допомогою спектральних даних можна визначати чистоту вуглецевих матеріалів, кількість шарів в графені та нанотрубках, визначати наявність функціональних груп на поверхні досліджуваних вуглецевих матеріалів.

У **четвертому розділі** визначені спектральні маркери взаємодії модельних ліпосом різного фосфоліпідного складу з протипухлинними препаратами оксаліплатину та

карбоплатину, а також наведені дані спектрального аналізу фосфоліпідів, виділених з різного типу пухлинних клітин. Окрім того, в Четвертому розділі визначені важливі спектральні маркери загальної фракції фосфоліпідів, виділених з чутливих та резистентних штабів пухлинних клітин. Показано, що всі особливості упаковки фосфоліпідів в клітинній мембрані, фазові стани та фазові переходи мають свої характерні особливості в спектрах ІЧ поглинання.

П'ятий розділ присвячено дослідженню спектральних особливостей колагену, що входить до складу тканини твердої мозкової оболонки та до складу Ахіллового сухожилля. Оскільки основна молекулярна складова цього типу тканин - колаген, такий вибір біологічних тканин дав можливість не виділяти колаген окремо, а проводити його аналіз методом ІЧ спектроскопії безпосередньо у складі досліджуваних тканин. Наведено результати вивчення особливостей конформаційної структури колагену з регенеруючи тканин твердої мозкової оболонки після змодельованої черепно-мозкової травми та проведено оцінку ефективності терапії *in vivo* з використанням полімерних плівок різних типів – на основі колагену, на основі хітозану, окремо та разом з плівкою желатину.

Висновки містять 11 положень, отриманих в дисертаційній роботі в результаті послідовного вивчення спектроскопічних маркерів взаємодії біологічних молекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами. Ці положення дозволяють встановити взаємозв'язки між спектральним маркерами та конформаційними властивостями досліджуваних біологічних об'єктів з метою їх практичного застосування для задач біології, біохімії, медицини, діагностики, а також для фундаментальних досліджень.

Особливо відзначу **найбільш цікаві і важливі з моєї точки зору результати роботи.**

1. В роботі встановлені спектроскопічні маркери характерних функціонально важливих взаємодій біологічних систем різної складності з наноструктурами та протипухлинними препаратами. Показано протекторні властивості двовимірних наночастинок нітриду бору в

складі комплексу з доксорубіцином та показано, що використання цих наночастинок зменшує на 10% токсичний вплив доксорубіцину на нормальні клітини, залишаючи незмінною токсичність доксорубіцину для пухлинних клітин. Таке зменшення токсичності має важливе практичне значення, адже дозволяє знизити негативний вплив хіміотерапії на здорові органи та тканини.

2. Показано можливості застосування двовимірних наночастинок сульфід вольфраму та нітриду бору для візуалізації біологічних клітин та їх складових, встановлено маркери когерентної антистоксової Раман-спектроскопії біологічних систем та проведено візуалізацію молекули ДНК, нанесеної на підложку з одношарового графену.

3. З використанням спектроскопічних маркерів показано, що протипухлинні препарати взаємодіють з фосфоліпідами через утворення водневих зв'язків між C=O та N-H групами фосфоліпідів та препаратів, про що свідчать зміни в області поглинання C=O та PO₂ молекулярних груп фосфоліпідів. За рахунок цієї взаємодії відбувається структурування мембрани та більш впорядкована упаковка ліпідів. Ці результати особливо важливі для медицини, адже відомо, що фосфоліпіди здатні інгібувати конформаційні переходи в лізоцимі в сторону переходу його в амілоїдні форми. Як вже відзначалося, лізоцим є ферментом, що руйнує мембрану вірусів, а тому ці дослідження є особливо актуальними для розробки новітніх ліків від хвороб, пов'язаних з амілоїдним патогенезом (хвороба Альцгеймера, Паркінсона, амілоїдоз та ін.) , а також розробки препаратів та вакцин від ковіду. Як відомо, вакцина, що на сьогодні вважається найбільш ефективною та має найменше побічних ефектів, створена у вигляді ліпосоми, всередині якої знаходиться частина вірусної РНК. Тому дослідження взаємодії різного роду лікарських засобів з модельними ліпосомами має пряме прикладне значення, а спектральний аналіз дозволяє на молекулярному рівні визначити структурні особливості ліпідних систем та визначити механізми взаємодії ліків з мембраною.

4. Варто відзначити розробку протоколу отримання модельних везикул різного фосфоліпідного складу з метою дослідження їх взаємодії з протипухлинними препаратами. В роботі запропоновано використати фулерени C₆₀ в сукупності з протипухлинним препаратом коніуму (препаратом на рослинній основі, виділеним з екстракту болиголову): за попередніми даними фулерен може суттєво підвищити потенціал коніуму та знизити його токсичність. Адже останнім часом використання фітопрепаратів стає все більш актуальним.

5. Вперше встановлено набір спектроскопічних маркерів для аналізу вторинної структури колагену у складі тканин Ахіллового сухожилля та у складі тканин твердої мозкової оболонки та показано спектральні відмінності між зрізами тканин новоутвореної та

рубцевої тканин, а також зафіксовано присутність залишків використаних для терапії плівок в зрізах тканин, відібраних через декілька тижнів після лікування.

Втім, разом із **загальною високою позитивною оцінкою** дисертаційної роботи, маю деякі **зауваження**:

1. Показано, що при взаємодії лізоциму з нанотрубками відбувається зростання вкладу β -антипаралельної конформації та зменшення вкладу α -спіралі, тобто що нанотрубки завдяки великій поверхневій енергії виступають каталізаторами утворення структур, які мають характерні риси амілоїдних фібрил, що і розкриває один з механізмів цитотоксичності вуглецевих нанотрубок. Автор не пропонує аналіз чи пояснення, чому саме утворюються саме такі структури та чому структури, збіднені на вміст альфа-конформації, є цитотоксичними або такими, що призводять або з'являються при захворюваннях, пов'язаних з амілоїдозним патогенезом. По-перше, хотілося б мати аналіз ролі гідрофобних та специфічних взаємодій між ліпосомами та білками у зниженні ступеня формування фібрил. По-друге, виникає питання, чи може негативна роль амілоїдних фібрил бути пов'язаною зі зменшенням ефективності таких структур накопичувати та передавати енергію і заряди в метаболічних процесах, оскільки, як відомо, найбільш ефективною структурою є саме альфа-спіраль, в якій має місце автолокалізація електронних збуджень з утворенням Давидовських солітонів?

2. Чи пов'язаний висновок про структурування мембрани та більше впорядкування упаковки ліпідів під дією протипухлинних препаратів зі зменшенням рівня безпорядку в системі, з яким тісно пов'язані онкологічні захворювання, що проявляється на різних фізичних, біологічних та фізіологічних рівнях, як про це свідчать численні дослідження.

Чи можна розширити використання експериментальних методів роботи на вивчення і аналіз рівня структурних безпорядків та фрактальних властивостей біологічних тканин, в тому числі з використанням наночастинок?

3. Автор пише, що ефект підсиленого поверхнею раманівського розсіювання (SERS ефект) пояснюється електромагнітним та хімічним механізмами, пов'язуючи електромагнітний механізм зі збільшенням локального електричного поля поблизу молекули і викликаного плазмонним резонансом в нанорозмірних частинках, а хімічний механізм пов'язуючи зі зростанням поляризованості молекули, адсорбованої на наноструктурованій поверхні, та переносі заряду між досліджуваною молекулою та підсилюючою поверхнею. Так, ці механізми різні, але вони обидва електромагнітні за своєю природою, тому вважаю недоречно використовувати термін “хімічний” механізм у даному контексті.

4. Було б важливим доповнити проведені дослідження вимірюванням впливу наночастинок та наноструктур на діелектричні властивості досліджуваних молекул та комплексів. Це пролило б світло на механізми взаємодії наноструктур з біологічними молекулами та системами, а також на механізми впливу цих структур на ефективність терапевтичної дії протипухлинних препаратів. Це було б важливим і для розуміння процесів загоювання ран та травм за участі колагену. Так, відомо, що фізичні властивості, в тому числі діелектричні властивості, спектри затриманої люмінесценції колагену та ін., істотно залежать від його вологості, що можна пов'язати саме зі зміною структурних властивостей колагену зі зміною вологості за рахунок наявності чи відсутності додаткових водневих зв'язків в елементарній комірці колагену. Чи не пояснюється факт сприяння використанню желатинової плівки паралельно з колагеновою повному відновленню тканин твердої мозкової оболонки без ознак утворення рубця саме тим, що желатинова плівка є джерелом додаткових водневих зв'язків у колагену?

5. Хотілося б мати порівняння результатів роботи автора з результатами досліджень здатності фосфоліпідів інгібувати формування амілоїдних фібрил лізоциму в залежності від кислотності середовища (рівня рН) та підвищеної температури без застосування наноструктур в роботі Vus, K. O., Trusova, V. M., Gorbenko, G. P., & Kinnunen, P. (1). Фосфоліпіди як інгібітори процесу утворення амілоїдних фібрил. Біофізичний вісник, 2016, 2(36), 37-42. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2016-36-05>. Ці результати ввійшли також в дисертаційну роботу Вус К.О. “Флуоресцентне детектування амілоїдних фібрил” (Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна <http://dspace.univer.kharkov.ua/handle/123456789/13885>).

6. І останнє. В дисертаційній роботі та авторефераті присутні деякі повтори (напр., “Метою роботи метою роботи” на ст. 34 дисертації, “Дослідження впливу комплексу комплексу 2D-BN наночастинок”, “та та”, та ін.), описки (напр., “макроскопічний стан” замість “макроскопічний” (ст.2 дисертації), “нейрогенеративні захворювання” замість “нейроДЕгенеративні захворювання), орфографічні помилки (автор пише “при чому”, маючи на увазі “причому”, “не зважаючи” замість “незважаючи”), іноді відсутні, а іноді зайві коми в реченнях, є деякі русизми (“актуальность”, “наробки” - див. автореферат). Є зауваження до оформлення автореферату. Так, в підпису до рис. 2 автореферату зазначено «криві 2 – 1 година культивування, 2- 2 години культивування, 3- 10 годин культивування», натомість має бути «криві 2 – 1 година культивування, 3- 2 години культивування, 4- 10 годин культивування». На рисунках спектрів вісь ординат має одиниці «в.о.». Що це? а.у. - довільні одиниці?

Проте, зазначені недоліки і запитання ніяким чином не впливають на загальну **високу оцінку роботи**, а скоріше підкреслюють її актуальність та необхідність подальших досліджень. Результати, представлені в дисертації, у **повному обсязі та своєчасно опубліковано** у двох монографіях та 19 статях у фахових виданнях, з яких 11 робіт опубліковані у фахових виданнях, віднесених до першого і другого квіртлів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal & Country Rank, а також **апробовано** на 31 вітчизняній та міжнародній наукових конференціях. Представлені результати є **достовірними та новими**, а сформульовані у дисертації висновки – науково **обґрунтованими**. У **авторефераті** досить повно викладено зміст дисертаційної роботи та адекватно і повною мірою відображені основні наукові положення дисертації.

На підставі всього вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота «**Спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами**», є завершеною науковою працею, яка повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., а її автор **Гнатюк Олена Петрівна** цілком заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

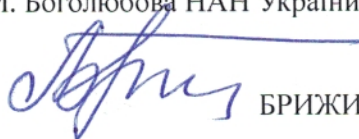
Офіційний опонент:

завідувач відділу теорії нелінійних процесів в конденсованих середовищах

Інституту теоретичної фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України,

доктор фізико-математичних наук,

старший науковий співробітник



БРИЖИК Лариса Свирідівна

“Підпис доктора фіз.-мат. наук. Л.С. Брижик засвідчую”

Вчений секретар Інституту теоретичної

фізики ім. М.М. Боголюбова НАН України

кандидат фізико-математичних наук



ПЕРЕПЕЛИЦЯ С.М.

“10” вересня 2021 р.