

ВІДГУК
офіційного опонента на дисертацію
Береста Володимира Петровича
«Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів»,
представлену на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук
за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Мембраноактивні пептиди зазнають багатьох впливів з боку інших малих молекул, фізичних полів, фізико-хімічних характеристик середовища, які можуть як підсилювати так і нівелювати програмований біологічний ефект. З'ясування способу виконання природними пептидами їх функцій дозволяє визначити роль цих сполук у регуляції процесів життєдіяльності в організмі та зрозуміти роботу самого організму, адже саме ці сполуки були відібрані в процесі еволюції для виконання певних функцій. Зокрема антимікробні пептиди є первинною ланкою імунної відповіді на мікробне чи вірусне ураження. Визначення молекулярного механізму дії антимікробних пептидів є засадничим принципом стратегії подолання мікробної резистентності. Мембранотропні пептиди мають високий потенціал для використання їх у якості ліків і з іншого боку є терапевтичними мішенями для дії фармпрепаратів та корекції патологічних станів. З огляду на це, виконане дисертаційне дослідження «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» є вельми **актуальним**.

У роботі визначено механізми взаємодії пептидних біополімерів з ліпідними мембранними матрицями, встановлено різні типи зовнішніх впливів, які можуть модулювати взаємодію пептидів з мембранами та регулювати біологічну відповідь. Отримані результати та пропоновані способи їх практичного використання, біодоступність та натуральність вивчених біополімерів та керуючих сигналів дозволяють розраховувати на їх швидке впровадження в медичну практику й розширення терапевтичного потенціалу зареєстрованих ліків. Дисертація Володимира Береста є завершеним кросдисциплінарним дослідженням, у якому інтегровано підходи молекулярної і клітинної біофізики, фізики поверхні для розв'язання проблем біомедицини й фармакології.

Дисертація складається з анотації, вступу, шести розділів, висновків, списку використаної літератури та додатка.

В **анотації**, згідно з вимогами до оформлення дисертації, коротко викладено узагальнений зміст основних розділів дисертації, подано основні результати дослідження із зазначенням наукової новизни та рекомендації щодо можливості практичного використання результатів роботи.

У **вступі** обґрунтовано вибір теми, проаналізовано зв'язок роботи з тематикою НДР кафедри та грантами, встановлено мету та завдання дослідження; перераховано використані методи біофізичного дослідження; сформульовано наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; визначено особистий внесок здобувача у наукові праці, опубліковані у співавторстві; зазначено конференції, на яких було проведено апробацію матеріалів дисертації та форму участі; означено структуру та обсяг дисертації.

Перший розділ присвячено критичному аналізу сучасних уявлень про механізми пептидно-мембранних взаємодій, будову та динаміку основних

компонентів біологічних мембран; висвітлено особливості структури та функціонування об'єктів дослідження, зокрема антимікробного циклічного олігопептиду граміцидину S, тромбоцитів людини. На основі проведеного аналізу літературних даних зроблено висновок про існування залежності біологічного ефекту пептидів від фазового та структурно-динамічного стану мембрани, сформульовано задачі дисертаційного дослідження.

У **другому розділі** охарактеризовано об'єкти дослідження; описано способи та протоколи отримання пріонових пептидів $^{169}\text{YSNQNNF}_{175}$ та $^{170}\text{SSQN NF}_{175}$, білка *gef1p* родини CLC каналів клітин *Saccharomyces cerevisiae*, методики приготування зразків природних мембран тромбоцитів, еритроцитів, мітохондрій гіпнокампа. У розділі визначено способи використання методів: ультрацентрифугування та гелелектрофорезу в поліакрил-амідному гелі з додецил сульфатом натрію для розділення субклітинних фракцій та визначення молекулярної маси білків; світлорозсіювання для аналізу змін форми та розміру клітин крові; бішарових ліпідних мембран для вивчення електрофізіологічних властивостей утворених пептидами іонних каналів на рівні одиничних молекул; НВЧ-діелектрометрії для визначення внеску гідратації компонентів у взаємодії у досліджуваних системах; УФ-спектроскопії для кількісного визначення продуктів реакцій; флуоресцентної спектроскопії для дослідження мембранного потенціалу та градієнту мікров'язкості ліпідів уздовж нормалі до мембрани; спектроскопії імпульсів опору й проточної цитометрії для визначення розподілу клітин за об'ємом і потенціалу проборою мембран еритроцитів; мікрофлюїдики для визначення електрокінетичного ζ -потенціалу еритроцитів; математичного моделювання для аналізу дезагрегації тромбоцитів під дією олігопептидного GS. Автором запропоновано способи модифікації щільності пакування ліпідів, поверхневого заряду та кривизни модельних мембран для визначення можливості керування мембранотропними ефектами досліджуваних пептидів. Зроблений із розділу висновок щодо адекватності застосованих методів для з'ясування молекулярних механізмів взаємодії природних пептидів з мембранними структурами та аналізу структурно-функціональних змін клітин внаслідок дії пептидів є обґрунтованим.

У **третьому розділі** викладено результати застосування одного з методів біофізики поодиноких молекул – реєстрації електропровідності бішарових ліпідних мембран – для аналізу каналоутворюючої спроможності пріонних пептидів при їх перерозподілі у модельні мембрани із водної фази, та рекомбінантного аналога *gef1p* при реконституції з мікросомальних везикул апарату Гольджі. Переконаливо доведено, що поліпептид *gef1p* дріжджових грибів *Saccharomyces cerevisiae* формує потенціалзалежні Cl^- іонні канали в модельних бішарових мембранах. Встановлено, що природний пептид $^{169}\text{YSNQNNF}_{175}$ та природно мутований $[\text{N} \rightarrow \text{S}]$ у положенні 171 пептид $^{170}\text{SSQN NF}_{175}$ людського пріонного білка PrP^{C} по різному впливають на провідність БЛМ. Визначено, що мутований $^{170}\text{SSQN NF}_{175}$, завдяки агрегації молекул при вбудовуванні в ліпідний бішар, утворює катіонселективні пори з різною провідністю в модельних мембранах, подібних за ліпідним складом до природних біомембран: фосфатидилхолін - 37%, фосфатидилетаноламін - 29%, фосфатидилінозитол - 18%, фосфатидилсерин - 3%, кардіоліпін - 7%, нейтральні ліпіди - 6%. Виявлено, що нативний пріонний пептид $^{169}\text{YSNQNNF}_{175}$ не формує іонних каналів у ліпідному бішарі. Порівняння ефектів пептидів у модельних мембранах та

мембранах внутрішньоклітинних органел – мітохондрій засвідчило, що обидва пептиди невиразно змінюють іонний транспорт на рівні клітин мозку в експерименті *in vitro*. При цьому автор небезпідставно припускає, що накопичення пріонних агрегатів в клітині *in vivo* під час розвитку патології може бути причиною пов'язаного з мутацією нейродегенеративного пріонного захворювання. Достатньо обґрунтованим є загальний висновок, сформульований за результатами досліджень, наведених у розділі 3, щодо встановленої кореляції між структурою пріонних пептидів та дезінтеграцією ліпідного бішару плоских модельних мембран та запропонованої гіпотези обумовленості утворення іонних каналів пріонним пептидом PrP [170-175] N171S різним агрегаційним потенціалом пептидів.

Вивчений автором антимікробний циклічний катіонний декапептид граміцидин S має крім бактеріостатичного ефекту побічний мембранолітичний ефект щодо клітин організму людини. Переважання ефектів визначається концентрацією пептиду. Для оптимізації клінічного застосування пептидного антибіотика у **четвертому розділі** детально проаналізовано структурні та функціональні зміни тромбоцитів людини після взаємодії цих клітин крові з GS. Вперше встановлено, що GS має як протизгортуючий так і тромболітичний ефекти й залежно від концентрації пригнічує агрегацію та викликає дезагрегацію тромбоцитів. Для визначення молекулярних механізмів взаємодії олігопептидного GS з плазматичними мембранами тромбоцитів методами світлорозсіювання та флуоресцентної мікроскопії проаналізовано кінетику зміни форми та дезагрегації клітин при температурах від 8 до 37°C; γ -опроміненні дозами 10-250 Гр; підвищенні рівня перекисного окислення ліпідів мембран та використанні антиоксидантів. Показано, що з'ясовану залежність швидкості взаємодії граміцидину S з мембраною клітин від температури, яка визначається рухливістю ліпідів мембрани, можна використовувати для визначення фазових переходів ліпідів мембран. Продемонстровано, що розрихлення ліпідного бішару полегшує вбудовування антимікробного пептиду GS до мембрани тромбоцитів. Проведено аналіз кінетики дезагрегації тромбоцитів на основі математичної моделі процесу, зроблено припущення стосовно механізму дезагрегації. Базуючись на результатах досліджень, дисертантом зроблено висновок про перспективність практичного використання граміцидину S для місцевої терапії надмірного згортання крові. Таким чином пропонується розширити терапевтичний спектр застосування сертифікованого фармпрепарату.

На відміну від багатьох досліджень антимікробних пептидів сфокусованих на визначенні цитотоксичної дії відносно мікроорганізмів, здобувачем визначено способи зменшення гемолітичного ефекту циклопептидного антимікробного GS щодо еритроцитів людини. Підвищення у такий спосіб терапевтичного індексу протимікробного препарату сприятиме можливості його системного використання для подолання загрозливо зростаючої стійкості збудників хвороб до наявних антибіотиків. Дослідженню неспецифічного способу ураження клітинних мембран граміцидином S, завдяки якому і після більше ніж півстоліття використання не зафіксовано випадків мікробної резистентності, присвячено **п'ятий розділ** дисертації. Встановлено монотонне збільшення швидкості та зменшення часу гемолізу еритроцитів в області температур 8-40°C. Показано, що модуляція гідрофобних взаємодій в мембрані підвищенням вмісту холестеролу та рівня ПОЛ

призводить до зниження плинності мембрани та її деформівності і веде до зниження швидкості взаємодії GS з мембранами. Цей висновок експериментально підтверджено у дослідях з еритроцитами хворих на серцево-судинні патології з порушенням ліпідного обміну: підвищення рівня холестерину та окислення ліпідів пригнічує гемолітичну активність GS. У той же час встановлено зниження міцності зв'язування пептиду з мембранами еритроцитів унаслідок зменшення щільності пакування ліпідів у бішарі при перекисному окисленні й гамма-опроміненні клітин *in vitro*. Ці результати матимуть **практичне використання** для раціонального конструювання аналогів GS зі зниженою гемолітичною активністю та вибору наноконтейнерів для доставки та спрямованого вивантаження пептиду. Автором проведено експериментальну верифікацію власної ідеї стосовно можливості модифікації мембранного ефекту GS модуляцією пептид-ліпідних взаємодій. Проведено дослідження гемолітичного ефекту циклопептиду іммобілізованого в нанорозмірні ДПФХ ліпосоми. Показано немонотонну залежність кінетичних параметрів гемолізу: лаг-періоду, швидкості, часу від концентрації пептиду та тривалості інкубації. Встановлено, що модуляція початкових етапів зв'язування пептиду з мембранами обумовлює швидкість перерозподілу пептиду в мембрани з іншої неполярної фази за сталих величин потенціалу електричного пробоя мембрани. Визначено внесок електростатичних взаємодій у зв'язування катіонного циклопептиду граміцидину S з еритроцитами. Встановлено, що GS у концентраціях від 5 до 20 мкг/мл зменшує ζ -потенціал інтактних еритроцитів частково нейтралізуючи негативний заряд сілових кислот та не впливає на ζ -потенціал модифікованих еритроцитів, які втратили більшу частину глікокаліксу внаслідок протеолізу нейрамінідазою. Проведене порівняння та розраховано енергії активації процесів пептид індукованої агрегації тромбоцитів та гемолізу еритроцитів засвідчило, що дифузія GS уздовж нормалі до мембрани йде швидше, ніж у латеральному напрямку й зумовлена відмінностями в структурі глікокаліксу та складі мембран клітин крові. Висновок автора про те, що модифікація гідрофобних, а також електростатичних взаємодій в мембрані впливає на зв'язування GS з клітинними крові є логічним та добре обґрунтованим встановленою кореляцією між ступенем модифікації структурного стану та фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару під впливом гамма-опромінення, про- та антиоксидантів, фармпрепаратів та кінетичними характеристиками гемолізу еритроцитів під дією GS.

У **шостому розділі** визначено біофізичні характеристики взаємодії олігопептиду GS зі штучними ліпідними мембранами різного ліпідного складу та різної геометрії: пласкі, сферичні, мультишарові. Запропоновано модель сорбції пептиду на мембрану із середовищ з різною діелектричною проникністю, в рамках моделі розглядається можливість дисоціації димерів пептиду при контакті з границею поділу та перерозподіл димерів у мембрану при зміні щільності пакування аніонних центрів зв'язування. Обґрунтуванням положень моделі є результати низки експериментів. Зокрема, виявлено екстремальну залежність структурно-динамічних параметрів бішару: мікрів'язкості, гідратації гідрофільних голівок ліпідів, температури та напівширини фазового переходу ліпідів від вмісту холестеролу з максимум в області 30%. Разом із цим визначено залежність параметрів зв'язування пептиду з модельними мембранами від величини та щільності поверхневого потенціалу та складу фосфоліпідів. Окрім структурних

особливостей ліпідного бішару, які контролюють зв'язування, знайдено можливість модуляції мембранних ефектів циклопептиду GS шляхом утворення комплексів із розгалуженим поліаніонним полімером D-g-РАА(РЕ). Доведено, що утворення комплексів з полімерним D-g-РАА(РЕ) носієм сприяє переважному вбудовуванню в ліпідні мембрани петидних олігомерів і зменшує прояви мембранотропної дії пептиду подібно до ефекту іммобілізації GS ліпосомальними наноконтейнерами, описаного у розділі 5. Сформульований загальний висновок до шостого розділу стосовно з'ясування молекулярних механізмів впливу антимікробного пептиду GS на фізичний стан ліпідного бішару модельних мембран; визначення немонотонного модулюючого ефекту холестеролу на утворення комплексів циклопептидного антибіотика GS з мембранами та встановлене збільшення анізотропії біофізичних характеристик ліпідного бішару у напрямку нормалі до поверхні мембрани при сорбції GS є обґрунтованим і безпосередньо витікає з аналізу сукупності результатів. Потрібно відзначити важливе для **практичного застосування** в нанобіофізиці, системах lab-on-a-chip чи штучних органів визначення змін гідратації комплексів пептиду з ліпосомами для контролю накопичення та вивільнення мембраноактивних пептидів з ліпідних наноносіїв і оцінки стійкості утворених комплексів.

Загалом роботу виконано на сучасному науковому рівні, використано адекватні до поставлених завдань інформативні методи досліджень та математичне моделювання, отримані результати є новими, статистично значущими, висновки та гіпотези є обґрунтованими та перевіреними використанням сукупності взаємодоповнюючих методів, порівнянням з наявними в літературі результатами інших дослідників. Окреслено перспективи подальшого розвитку робіт у напрямку дослідження. Текст дисертації та автореферат написані гарною українською науковою мовою та відповідним чином проілюстровані. Автореферат повністю відображає зміст дисертації і відповідає встановленим вимогам до оформлення.

Результати наукових досліджень, за якими здобувач захистив кандидатську дисертацію, не винесено на захист у його докторській дисертації.

Наукова **новизна** та **актуальність** дисертації підтверджується також публікацією основних результатів роботи у 24 статтях у наукових фахових виданнях України та наукових періодичних виданнях інших держав, а також доповідях на 20 наукових конференціях.

Разом з тим, при загальній позитивній оцінці роботи у рецензента є низка **зауважень** та запитань:

1. Наскільки використані в роботі пептиди є природними, адже як витікає з розділу 2, частина з них була синтезована хімічно чи біотехнологічно?
2. У розділі 2 занадто детально описано принципи роботи стандартного фотоелектроколометра та проточного цитоаналізатора, проте способом розрахунку гідратації досліджених зразків виділено лише дві формули.
3. Суперечливими виглядають результати вивчення методом світлорозсіювання набрякання та зміни форми тромбоцитів під дією пептиду. Чому різноспрямовані зміни оптичної густини відповідають однаковим за співвідношенням «площа поверхні / об'єм» змінам морфології клітин? Чи проводились дослідження обох явищ іншими методами?

4. У таблицях 5.2 – 5.7 немає колонки «контроль», вказано лише достовірність відмінностей експериментальних груп від вихідного стану, це ускладнює сприйняття результатів.

5. У розділі 6 феноменологічну модель сорбції мономерів та олігомерів пептиду граміцидину S у ліпідні мембрани запропоновано за результатами модельного експерименту та аналізу даних літератури, чи є підтвердження цієї моделі за результатами експериментів з природними мембранами?

6. Недостатньо уваги приділено обговоренню отриманих в дисертації наслідків впливу малих сублітичних доз антимікробного поліпептидного антибіотика GS на рівні організму людини.

Наведені зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. Дисертація Береста В.П. «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» є завершеною науковою працею, в якій отримано науково обґрунтовані результати стосовно молекулярних механізмів взаємодії коротких біополімерів – пептидів з клітинними мембранами які забезпечують розв'язання важливої прикладної проблеми молекулярної та клітинної біофізики пов'язаної з можливістю керування біологічними ефектами природних пептидів.

Вважаю, що за актуальністю проведеного дослідження, науковою новизною і достовірністю отриманих результатів, обґрунтованістю наукових висновків і сформульованих рекомендацій для практичного використання, повнотою опублікування результатів, особистим внеском здобувача дисертація Береста Володимира Петровича «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» відповідає вимогам пунктів 9, 10, 12, 13 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. зі змінами, а її автор – Берест Володимир Петрович – заслуговує на присудження йому наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент
провідний науковий співробітник
лабораторії кріопротекторів
Інституту проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України,
доктор фізико-математичних наук,
професор



Осецький Олександр Іванович

*Особистий секретар Олександра Івановича
Олександра Івановича завершено
успішним експертом Інституту
проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України канд.
Кеоватова І.О. Кез*

13.12.2021

