ВІДГУК

офіційного опонента
на дисертацію Береста Володимира Петровича
«Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів»
на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук
за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки)

Дослідження В. П. Береста, спрямоване на визначення молекулярних механізмів взаємодії пептидів з ліпідними мембранами та ліпідно-білковими агрегатами, є актуальною та своєчасною біофізичною роботою, що робить значний внесок у наукову проблему, яка є важливою як у фундаментальному так і прикладному аспектах. У дисертації ретельно виконано комплексні експериментальні та теоретичні дослідження, які мають потенціал для вдосконалення методів діагностики та з'ясування молекулярних механізмів деяких захворювань та патологічних станів.

У дисертації визначено біофізичні характеристики взаємодії пептидів з ліпідними мембранами, встановлено кореляції між фазовим станом ліпідів, упорядкованістю, мікров'язкістю, гідратацією, щільністю поверхневого заряду мембран, геометрією бішарів та мембранними ефектами кількох класів пептидів. Ідентифіковано залежність біологічного відгуку від модифікацій первинної структури, міжмолекулярних взаємодій та комплексоутворення досліджених пептидів за умов різних температур, модуляції гідрофобних та електростатичних взаємодій у мембранах.

Дисертаційна робота має класичну структуру та складається з шести розділів.

У *вступі* обґрунтовано актуальність обраної теми, зазначено цілі та завдання роботи, вказано об'єкт та предмет дослідження, окреслено наукову новизну та практичну цінність результатів дисертації, чітко визначено внесок автора у спільні публікації, наведено дані щодо апробації положень дисертації.

Перший розділ присвячено огляду структури та механізмів мембранних ефектів мембранотропних пептидів, наведено дані щодо структурних та динамічних характеристик біологічних мембран, охарактеризовано морфологічні та функціональні перетворення клітин крові при виконанні ними властивих фізіологічних функцій та розвитку певних патологічних станів. На основі проведеного аналізу даних наукової літератури сформульовано завдання дисертаційного дослідження та доцільність використання обраних підходів до вирішення поставлених завдань.

У *другому розділі* висвітлено основні методи дослідження та охарактеризовано експериментальні зразки. Описано процес створення та виділення рекомбінантних та синтетичних поліпептидів. Відзначено особливості використання техніки чорних ліпідних мембран для реконституції поодиноких іонних каналів з мембранних везикул та водних розчинів. Проаналізовано застосовність методу світлорозсіювання для аналізу змін форми та об'єму клітин крові та вивчення агрегації тромбоцитів та гемолізу еритроцитів. Обґрунтовано використання методу резонансної НВЧ-діелектрометрії для визначення гідратації штучних ліпідних мембран та їх комплексів з пептидами, для оцінки накопичення в нанорозмірних ліпосомних

носіях мембраноактивних пептидів та кінетики їх вивільнення. Наведено опис вдосконаленої методики вивчення електрофоретичної рухливості клітин та застосування спектроскопії імпульсів опору для визначення показників електромеханічної стабільності мембран клітин крові при зв'язуванні з пептидами. Зроблено обґрутований висновок про відповідність використаного набору експериментальних методів дослідження для всебічного аналізу взаємодії пептидів з біоеквівалентними та природними мембранами.

У *третьому розділі* подано результати вивчення біофізичних характеристик іонних каналів, утворених у модельних ліпідних мембранах пептидами, що повторюють послідовність людського білка пріона та білка сімейства CLC дріжджових грибів *S. cerevisiae*. На рівні поодиноких молекул ретельно проаналізовано електропровідність каналів, сформованих у пласких азолектинових мембранах пептидами нормальної та мутованої пріонної послідовності PrP. Виконано аналіз кінетики зміни струмів за різних протоколів проведення одномолекулярних експериментів, гаусова декомпозиція амплітудних гістограм та розраховані з вольт-амперних характеристик провідності утворених мутованим пептидом PrP. Показано формування каналів внаслідок агрегації молекул пептиду в мембрані. Визначено добру узгоджуваність цього висновку з агрегаційними властивостями застосованого пептиду, передбаченими кількома алгоритмами аналізу вторинної структури амінокислотних послідовностей з використанням штучного інтелекту та експериментів з маркерами амілоїдогенезу. Автор небезпідставно припускає що пептид, який містить послідовність білка пріона SSQNNF – PrP [170-175] – і має природну мутацію в положенні 171 [N → S], пов'язану з психічним розладом у людей може впливати на іонну рівновагу на клітинній плазматичній мембрані, а здатність мутованого пептиду утворювати іонні канали, на відміну від немутованого пептиду, може бути причиною відповідного нервового розладу.

Також у *розділі 3* визначено молекулярну масу й топологію розташування в мембрані та електрофізіологічні властивості білка Gef1p дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, який має амінокислотну послідовність гомологічну до сімейства хлоридних потенціалзалежних каналів CLC. Проведено аналіз двох способів модифікації роботи Gef1p внутрішньоклітинних мембран. Вбудовування в модельні мембрани мікросомної фракції, отриманої зі штаму дріжджів, який вробляє Gef1p, дозволило встановити що ані модифікація пептиду ковалентним приєднанням до нього зеленого флуоресцентного білка з утворенням химерного Gef1-GFP, ані його колокалізація в мембрані з іншим Mnt1-myc інтегральним маркерним білком апарату Гольджі грибів *S. cerevisiae*, не впливають на біологічну активність Gef1p та здатність утворювати іонні канали в штучних мембранах. Виконано кінетичний аналіз струмів Gef1p у БЛМ із суміші фосфатидилсерину та фосфатидилетаноламіну, виміряно провідність у 42 пС на рівні поодиноких іонних каналів, визначено аніонну селективність каналу утвореного цим пептидом, обраховано імовірність перебування каналу у відкритому стані та зроблено обґрунтований висновок про його потенціалозалежність із переважанням закритого стану при накладанні від'ємних трансмембранних різниць потенціалів. Зроблено порівняльний аналіз результатів з даними літератури, висунуто доцільне

припущення, що передбачувана за первинною послідовністю роль Gef1p у клітині полягає у забезпеченні компенсаційного транспорту аніонів Cl^- до апарату Гольджі для регуляції pH усередині цього внутрішньоклітинного компартмента.

Четвертий розділ та п'ятий розділи присвячено детальному аналізу взаємодії циклічного декапептидного антибіотика граміцидину S з мембранами тромбоцитів й еритроцитів для визначення способів зниження його побічної дії. Для новосинтезованих аналогів GS з потенційно ослабленою гемолітичною активністю антимікробний тест супроводжується аналізом гемолітичної активності, при цьому ні GS, ні його аналоги не тестувалися щодо інших клітини крові.

У *розділі 4* вивчено вплив особливо актуальних сублітичних кількостей GS на тромбоцити та агрегати тромбоцитів і знайдено абсолютно нові клітинні ефекти пептиду. Встановлено, що взаємодія GS з тромбоцитами залежить від концентрації та призводить до набрякання тромбоцитів або зміни їх форми. GS зумовлює дезагрегацію фізіологічно сформованих тромбоцитарних агрегатів. Мілімолярні концентрації пептиду пригнічують функціонування тромбоцитів. Показано, що швидкість взаємодії GS з мембранами тромбоцитів залежить від рухливості мембранних ліпідів і значно зростає з підвищенням температури, а також залежить від стану мембранних ліпідів. Визначено, що фактори, які впливають на мембранні ліпіди: температура, перекисне окислення ліпідів, іонізуюче γ-опромінення – змінюють взаємодію GS з тромбоцитами завдяки підвищенню плинності мембрани, утворенню дефектів упаковки в ліпідному бішарі, збільшенню швидкості дифузійних процесів у мембранах, що полегшує включення GS в мембрану клітин. Оцінено кількість молекул GS на 1 $мм^2$ мембрани тромбоцита, необхідних для дезагрегації клітин. Для аналізу дезагрегації тромбоцитів використано розроблену математичну модель кінетики індукованої агрегації тромбоцитів. Розраховано модельні константи швидкостей реакцій за експериментально визначеними середніми кількостями тромбоцитів у агрегаті, отриманими методом світлорозсіювання.

П'ятий розділ висвітлює роль гідрофобних та електростатичних взаємодій у зв'язуванні GS з мембранами еритроцитів. Наведено результати кінетики світлорозсіювання суспензії еритроцитів при HCl- та пептид-індукованому гемолізі, визначено потенціал пробою та ζ-потенціал мембран, розподіл клітин за об'ємом. Зокрема встановлено, що підвищення рівня холестеролу завдяки зменшенню плинності мембрани та її деформації, веде до зниження швидкості взаємодії GS з мембранами та значно послаблює гемолітичну активність GS. Базуючись на результатах досліджень еритроцитів з крові донорів з коронарним атеросклерозом, дисертантом зроблено висновок, що перекисне окислення ліпідів, завдяки зміні гідратації, призводить до значного зниження вбудовування пептиду в мембрани еритроцитів. Проведено порівняльний аналіз зв'язування олігопептидного катіонну GS з мембранами еритроцитів з частково видаленим глікокаліксом. З'ясовано, що величина поверхневого потенціалу мембрани визначає кінетику сорбції пептиду на мембрану. Ідентифіковано засобами мікрофлюїдіки перерозподіл еритроцитів за об'ємом зі зменшенням середнього об'єму клітин при вбудовуванні сублітичних концентрацій пептиду. Показано, що модуляція електростатичних

та гідрофобних взаємодій інкапсуляцією циклопептиду в сферичні ліпосоми змінює кінетику перерозподілу GS в мембрани еритроцитів. За змінами характеристик дифузії, форми та об'єму клітин доведено, що нанорозмірні ліпосомні контейнери здатні локально знижувати гемолітичну активність антитимікробних пептидів. Автор переконливо доводить, що сорбція катіонного бета-структурного пептиду GS на мембрани клітин крові визначається електростатичним «впізнаванням» зарядженою поверхнею, перерозподіл пептиду з жорсткою внутрішньою структурою в мембрану надалі визначається рухливістю, щільністю пакування, складом ліпідів і може регулюватися зміною відповідних параметрів навіть у вузьких фізіологічних межах.

У *шостому розділі* дисертації виявлено механізми керування мембрано спрямованою активністю антимікробного пептиду GS у модельних ліпідних системах різного ліпідного складу та різної топології. Використано штучні ліпідні мембрани, які моделюють різні типи біологічних мембран як клітин людини так і мікроорганізмів. Показано немонотонну залежність параметрів зв'язування олігопептиду з мембранами від вмісту холестеролу, зокрема спорідненість GS до холестерол-збагаченої фази в мембранах із 10 мас. % холестеролу. Охарактеризовано 2 типи зв'язування GS із ліпідними мембранами, які відповідають зв'язуванню мономерів та олігомерів GS. Розраховано термодинамічні параметри зв'язування. Зареєстровано дегідратацію фосфатних груп фосфоліпідів при зв'язуванні з GS. Визначено ступені гідратації та перерозподіл молекул води між вільними та зв'язаними станами в комплексах граміцидину S з ліпосомами різного ліпідного складу. Присутність зірчастого поліаніонного декстран-графт-поліакрил-амідного сополімеру D-g-PAA(PE) модулює взаємодію GS з фосфатидилхоліновою мембраною зменшуючи загальний мембранотропний ефект та сприяючи, як і у випадку з допатном холестеролом, переважному зв'язуванню з мембраною олігомерів GS. Базуючись на результатах досліджень, дисертант пропонує феноменологічну модель сорбції пептиду на межі поділу «ліпідна мембрана – полярний розчинник». Передбачаєтья дисоціація олігомерів пептидів в області інтерфейсу перед зануренням у бішар, уведення холестеролу сприяє переважній адсорбції димерів пептиду. За результатами досліджень визначено механізм взаємодії пептидного антибіотика GS із біологічними мембранами та окреслено шляхи оптимізації використання GS, визначено нові можливі мішені його дії та перспективи створення нових лікарських форм або способів його інкапсуляції та спрямованої доставки.

Загалом роботу виконано на високому науковому рівні з використанням складної дослідницької апаратури, сучасних експериментальних методів та математичного моделювання, що свідчить про високий фаховий рівень здобувача. Основні результати є новими і отримані автором вперше. Наукові положення та висновки дисертації є обґрунтованими завдяки достатньому обсягу отриманих експериментальних даних та теоретичному аналізу, а також завдяки їх порівнянню з результатами інших дослідників. Достовірність результатів не викликає сумніву, оскільки вони отримані з використанням класичних надійних експериментальних методичних підходів, ретельно

оброблені статистично та проаналізовані. Текст дисертації та автореферат задовільно написані та проілюстровані. Автореферат вірно відображає зміст дисертації. Основні результати роботи опубліковано у 24 статтях у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах (з урахуванням квартильних коефіцієнтів журналів за класифікацією SCImago), а також широко доповідались та обговорювались у вигляді доповідей та презентацій на 20 міжнародних наукових конференціях.

Серед численних результатів дисертації, виокремлю один, який є найбільш цікавим з моєї точки зору. Встановлено кореляцію між теоретично передбаченою схильністю до агрегації пептиду, отриманого з пріонного білка, з амінокислотною послідовністю 169YSNQNNF175 багатою аспарагіном та глутаміном, та експериментально встановленим утворенням K^+-каналів мутованим пептидом. Це підтверджує обговорювану у науковій літературі гіпотезу щодо зумовленості патогенних властивостей пріонного білка його впливом на гомеостаз іонів та дозволяє рекомендувати використання в медичній та ветеринарній практиці фармакологічних модуляторів калієвих каналів для лікування або послаблення симптомів пріонних нейродегенеративних захворювань у людей та тварин.

Разом з тим, при загальній позитивній оцінці, робота не позбавлена деяких недоліків, які стосуються, в основному, оформлення та подачі матеріалу. Зокрема, маю висловити такі зауваження:

1 В авторефераті та тексті дисертації досить багато неповних та недостатньо точних тверджень. Наприклад написано “специфічна функція мембранотропних пептидів залежить від їх первинної послідовності й конформаційної динаміки”, тоді як існує залежність не лише від динаміки, а й від конформації як такої.

2 Систематично використовується застаріла та хімічно некоректна назва “холестерин” замість правильної “холестерол”.

3 Використання кирилічних абревіатур назв ліпідів (на кшталт ДПФХ), на мій погляд, є вкрай невдалою практикою, бо вимагає їх постійного перекладу в умі для отримання звичних з літератури англомовних абревіатур.

4 У розділі 2.3 спочатку сказано, що створювали 4 типи модельних мембран, а у наступному абзаці до них чомусь додаються ще 5, які частково повторюють перші чотири. То скільки їх було всього? Також не зрозуміло чому використовувалися суміші з різними кількостями холестеролу, але лише одна з 10% кардіоліпіну. Автор пише: “варіювання ліпідного складу ліпосомальних мембран молекулами кардіоліпіну та холестерину дозволяє моделювати щільність поверхневого заряду ліпосом та щільність упаковки ліпідних хвостів...”, але вміст кардіоліпіну при цьому не варіювався взагалі, а вміст холестеролу впливає не стільки на щільність упаковки ліпідів як таких (а не тільки їх хвостів!), як на структурну жорсткість та фазовий стан мембрани. Подібних неточностей у тексті дисертації, на жаль, досить багато.

5 Частина математичних формул у дисертації вставлена у вигляді растрових малюнків низької роздільної здатності, що виглядає вкрай непривабливо. Так само деякі малюнки, наприклад 6.12, мають непристойно низьку якість зображення.

6 На частині малюнків, наприклад 6.13, 6.14, проведено апроксимуючі лінії між експериментальними точками, але не вказано яким методом (сплайни, ковзаюче середнє, щось інше?).

7 Згадки персоналізованої медицини в контексті отриманих результатів є, на мій погляд, занадто оптимістичними. На сьогодні я не бачу реальних можливостей для використання результатів роботи у розробці персоналізованих терапевтичних та діагностичних технологій.

Проте, ці зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Дисертація Береста В. П. «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» є завершеною науковою працею, в якій вирішено важливу проблему молекулярної та клітинної біофізики щодо з'ясування механізмів керування мембранотропною активністю природних пептидів. Отримані у роботі результати є підґрунтям для більш глибокого розуміння молекулярних механізмів цитотоксичної дії антимікробних пептидів, каналоутворюючої та агрегаційної активності пріонів та розробки нових ефективних стратегій запобігання розвитку мікробної резистентності та «канальних» патологій.

За обсягом проведених досліджень, якістю, актуальністю, науковою новизною і достовірністю отриманих результатів та повнотою їх викладення, особистим внеском здобувача дисертація Береста Володимира Петровича «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» повністю відповідає вимогам пунктів 9, 10, 12, 13 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., 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
відділу фізики біологічних систем
Інституту фізики НАН України,
доктор фізико-математичних наук,
старший науковий співробітник Семен Олександрович Єсилевський

ВІРНО
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР
ІФ НАН УКРАЇНИ
В. С. МАНКАРА

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ * КИЇВ * ІНСТИТУТ ФІЗИКИ Ідентифікаційний код 05417302