

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Пашинської Влади Анатоліївни «Мас-спектрометричні маркери та молекулярно-фізичні механізми дії біологічно активних речовин», подану на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки)

Дисертація Пашинської Влади Анатоліївни «Мас-спектрометричні маркери та молекулярно-фізичні механізми дії біологічно активних речовин» присвячена актуальній проблематиці сучасних біофізичних досліджень, що пов'язана з встановленням молекулярно-фізичних механізмів процесів, в яких задіяні біологічно активні речовини. Дослідження в рамках цієї тематики можна кваліфікувати як фундаментально-прикладні, оскільки їх результати є важливими для розвитку фундаментальної біофізичної науки, а також можуть бути безпосередньо використані для вирішення широкого кола сучасних прикладних наукових проблем. Зокрема, успіхи у дослідженні фізичних механізмів взаємодії біологічно активних сполук, насамперед ліків, з біомолекулами та наноматеріалами заклали основу бурхливого розвитку в 21 сторіччі науково-технологічних напрямків з розробки нових функціональних матеріалів і наноструктур для ефективної доставки ліків, для створення штучних біосумісних трансплантантів та регенеративних засобів, що, в свою чергу, призвело до значного прогресу в біомедичній галузі та покращенні стандартів життя людей. Але багато фундаментальних та прикладних наукових питань в зазначеній тематиці залишаються відкритими, що зумовлено різноманіттям молекулярно-фізичних процесів, зокрема й міжмолекулярних взаємодій фізичної природи, в які вступають молекули біологічно активної речовини при взаємодії з біосистемами та оточенням. Саме пошук відповідей на ці актуальні наукові питання для конкретних біологічно активних сполук (ряду лікарських агентів та органічних сполук з довкілля) став основою багаторічного системного дослідження Пашинської В.А., результати якого викладено в дисертації.

Сьогоденність проведених в рамках роботи досліджень фізичних механізмів процесів за участю біологічно активних молекул визначається застосуванням для вирішення поставлених біофізичних завдань комплексу сучасних фізичних методів, а саме потужних експериментальних методів мас-спектрометрії, газової хроматографії та квантово-механічних розрахункових методів DFT, MP2 та РСМ.

Про актуальність теми дисертації Пашинської В.А. свідчить також її тісний зв'язок з міжнародними та державними науковими програмами та проєктами, які затверджувалися на конкурсній основі та проходили ретельне фахове рецензування.

Дисертаційна робота здобувачки, яка є старшою науковою співробітницею Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, як зазначено в дисертації, виконувалась в рамках відомчих тем відділу молекулярної біофізики ФТІНТ в період з 2002 до 2022 рр., серед яких відзначу наступні: “Дослідження міжмолекулярних взаємодій та конформаційних переходів в комплексах біологічно активних речовин з нуклеїновими кислотами різного рівня структурної організації та їх компонентами”; “Дослідження структури і визначення енергетичних характеристик нанобіогібридів, сформованих біополімерами та їх компонентами з вуглецевими нанотрубками, хромофорами та іонами металів”; “Біофізичні властивості складних нанобіоструктур, сформованих вуглецевими нанотрубками, біополімерами та біоактивними лігандами” та ін. До докторської дисертації Пашинської В.А. також увійшли результати, що отримані особисто здобувачкою в рамках проєктів наукового співробітництва між Національною академією наук України та Угорською академією наук (2010 - 2021 р.). Частина результатів дисертації отримана Пашинською В.А. під час її роботи як запрошеного дослідника в мас-спектрометричній лабораторії університету м. Антверпен (Бельгія).

Наукові результати та основні положення дисертації «Мас-спектрометричні маркери та молекулярно-фізичні механізми дії біологічно

активних речовин» повністю викладено в 22 статтях в авторитетних наукових фахових виданнях, 12 з яких опубліковані в журналах, віднесених до першого і другого квартилів відповідно до класифікації SCImago Journal & Country Rank, а 4 статті – в журналах третього квартилю. 5 наукових статей надруковано в періодичних виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України, та 1 стаття – в закордонному науковому фаховому виданні. Відмічу також досить високий рівень цитування ряду наукових робіт здобувачки, що демонструє зацікавленість наукової спільноти в отриманих наукових результатах та підтверджує їх вагоме наукове значення. Так, на сьогодні загальна кількість цитувань робіт за співавторством Пашинської В.А. (за даними Google Scholar) становить більше 2500, а її h-index – 13 (h10-index – 17), h-index здобувачки в базі Scopus - 11. Результати дисертаційної роботи були також апробовані на багатьох міжнародних наукових конференціях. До списку наукових праць дисертації включено 23 тези доповідей на міжнародних конференціях, при цьому я неодноразово персонально була слухачем доповідей пані Пашинської на наукових заходах з представленням результатів дисертації, які були всебічно обговорені в фаховому середовищі. Абсолютна більшість наукових публікацій здобувачки написані англійською мовою у співавторстві з іноземними колегами в рамках наукового співробітництва, що, на мій погляд, демонструє інтегрованість її наукової діяльності в сучасні міжнародні наукові дослідження та підтверджує відповідність отриманих результатів сучасним світовим науковим стандартам. Особистий внесок Пашинської В.А. в спільні з співавторами наукові праці, що детально описаний в дисертаційній роботі, свідчить про набуття здобувачкою високого рівня компетентностей в галузі планування та проведення наукових досліджень з застосуванням сучасних фізичних методів, отримання достовірних результатів та їх представлення в наукових працях, що є необхідним для здобуття наукового ступеню доктора наук.

Переходячи до загального аналізу дисертаційної роботи «Мас-спектрометричні маркери та молекулярно-фізичні механізми дії біологічно

активних речовин», зазначу, що дисертація Пашинської В.А. оформлена як кваліфікаційна наукова праця для наукової доповіді згідно до вимог для докторських дисертацій, затверджених Наказом №1220 МОН України «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук» від 23.09.2019р., оскільки кількість статей за темою дисертації, опублікованих в високореєтингових журналах Q1 і Q2 є більшою ніж 10. Така форма представлення дисертації передбачає, що розділами дисертації є статті, які відображають основні результати наукової роботи. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, підрозділами яких є наукові публікації здобувачки, висновків, переліку використаних джерел та додатку. Дисертація викладена українською мовою в науковому стилі, матеріал структуровано логічно та послідовно, що дозволяє отримати цілісне враження від проведених досліджень. Дисертація супроводжується Рефератом, що містить характеристику роботи та відображає основний зміст наукових пошуків та отриманих результатів. Дисертація як кваліфікаційна наукова праця підготовлена здобувачкою самостійно. Використані в дисертації та в статтях, що входять до складу дисертації, ідеї, положення та результати інших авторів та співавторів наукових публікацій мають відповідні посилання.

Зміст дисертаційної роботи Пашинської В.А. повністю відповідає паспорту спеціальності 03.00.02 – біофізика фізико-математичних наук.

У вступі дисертаційної роботи обґрунтовано актуальність тематики наукових досліджень, вказано мету та завдання дослідження, висвітлено новизну, наукове та практичне значення отриманих результатів, а також детально описано особистий внесок здобувачки у спільні з співавторами публікації.

Розділ 1 дисертації містить наукові статті, що висвітлюють результати комплексних біофізичних досліджень міжмолекулярних взаємодій біологічно активних речовин (представників груп протималарійних, протимікробних, противірусних лікарських сполук) з потенційними біомолекулами-мішенями та їхніми компонентами в модельних системах *in vitro* із застосуванням

експериментального методу мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням та методів квантово-механічних розрахунків DFT та MP2. Коло досліджених біологічно активних речовин є досить широким та включає протималярійні агенти артемізинінового ряду, протиінфекційні бісчетвертинні амонієві солі та рамноліпіди, противірусний агент тілорон, кардіопротекторний препарат флокалін. В роботах цього розділу визначені мас-спектрометричні маркери формування стабільних нековалентних комплексів означених лікарських агентів з біомолекулами, що пов'язано з реалізацією біологічної активності цих сполук. З метою удосконалення експериментально-методичної бази біофізичних досліджень в розділі представлено результати щодо оптимізації методу мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням для визначення міжмолекулярних взаємодій мембранотропних агентів (таких як декаметоксин, етоній та інші).

Розділ 2 дисертаційної роботи складається з наукових публікацій, що містять результати вивчення фізичних механізмів сукупної дії біологічно активних агентів різних груп (наприклад протималярійних артемізинінових агентів та аскорбінової кислоти, або бісчетвертинних амонієвих сполук та ацетилсаліцилової кислоти) на модельні біосистеми. В рамках проведених досліджень визначено мас-спектрометричні маркери процесів парного комплексоутворення між молекулами досліджених лікарських речовин різних груп у полярному середовищі та показано явище міжмолекулярної конкуренції цих біологічно активних агентів за зв'язування з мембранними фосфоліпідами (на прикладі дипальмітоїлфосфатидилхоліну), що розглядається як молекулярний механізм ймовірної модифікації біологічної дії зазначених ліків при їхньому одночасному застосуванні.

Розділ 3 дисертації присвячено дослідженням структурної стабільності біологічно активних бісчетвертинних амонієвих сполук в умовах сольватного оточення із застосуванням різних м'якоіонізаційних мас-спектрометричних методик. В статтях цього розділу доведено, що взаємодія дикатіонів декаметоксину та етонію з протийонами сольватного оточення стабілізує

структуру цих протиінфекційних агентів, а також отримано характеристичні мас-спектрометричні маркери процесів фрагментації бісчетвертинних сполук в умовах мас-спектрометричного експерименту. Також в розділі 3 викладено результати вивчення особливостей гідратації дикатіону декаметоксину розрахунковим методом АМ1.

Розділ 4 дисертації складається зі статей, що висвітлюють результати наукової роботи здобувачки в напрямку розвитку експериментальних методів біофізичних досліджень, а саме результати розробки та апробації методики на базі методу газової хроматографії/мас-спектрометрії (ГХ/МС) задля визначення мас-спектрометричних маркерів біологічно активних речовин, що є складовими частинками атмосферних аерозолів. Статті цього розділу містять дуже цікаві результати застосування розробленої ГХ/МС методики в масштабних міжнародних біосферних дослідженнях зразків атмосферних аерозолів, які дозволили не тільки отримати важливі дані щодо молекулярного складу та молекулярно-фізичних процесів в атмосферних аерозолях, а й виявити раніше неописані біологічно активні поліоли в складі аерозольних частинок.

У Висновках дисертаційної роботи узагальнено результати проведених досліджень та викладено основні положення, що виносяться на захист.

Уважно вивчивши матеріали докторської дисертації «Мас-спектрометричні маркери та молекулярно-фізичні механізми дії біологічно активних речовин», як опонент, можу стверджувати, що зроблені в роботі висновки та рекомендації є добре обґрунтованими та логічними, оскільки вони сформульовані на основі експериментальних та теоретичних даних, отриманих здобувачкою за допомогою добре апробованих та надійних фізичних методів мас-спектрометрії, ГХ/МС та сучасних методів квантово-механічних розрахунків. Достовірність представлених результатів щодо формування стабільних комплексів молекул біологічно активних речовин між собою та з біомолекулами підтверджується також позитивною кореляцією між експериментальними даними мас-спектрометрії та результатами квантово-

механічних розрахунків. Отримані в рамках дисертації наукові результати добре узгоджуються з результатами інших науковців в рамках тематики досліджень здобувачки, що викладені в науковій літературі, та не суперечать сучасним ідеям та уявленням в галузі молекулярної біофізики.

Уважне вивчення докторської дисертації «Мас-спектрометричні маркери та молекулярно-фізичні механізми дії біологічно активних речовин» та наукових публікації, що увійшли до дисертації, дозволяє стверджувати, що результати цієї роботи мають досить вагоме наукове та практичне значення, є оригінальними та характеризуються науковою новизною. Персонально мені, як фахівцю, що активно працює в напрямку вивчення міжмолекулярної взаємодії біомолекул та біологічно активних сполук, включаючи проблематику гідратації біомолекул, найбільш цікавими здаються наступні результати роботи:

- Вперше за допомогою мас-спектрометричних маркерів показано формування в системах *in vitro* стабільних нековалентних комплексів молекул широкоживаних протималарійних препаратів артемізинінового ряду з їхньою потенційною молекулярною мішенню – Fe(III)-гемом – та запропоновано молекулярно-фізичний механізм, пов'язаний з протималарійною активністю цих лікарських сполук.
- Вперше експериментально доведено формування стабільних асоціатів артемізиніну та дегідроартемізиніну з азотистими основами нуклеїнових кислот аденіном, цитозином та метилтиміном в полярному середовищі, що може пояснювати протипухлинну активність артемізинінових агентів, виявлену в ряді клінічних досліджень.
- Вперше експериментально встановлено утворення в розчині стабільних нековалентних комплексів молекул антибіотика циклосерин з потенційною біомолекулою-мішенню – N-ацетил-D-глюкозаміном, що запропоновано розглядати як фізичну складову процесу пригнічення формування клітинної стінки бактерій, пов'язаного з протибактеріальною дією препарату.

- Вперше методом мас-спектрометрії визначено селективне формування нековалентних комплексів флокаліну з протонованими амінокислотами лізин та треонін, а методами квантово-механічних розрахунків визначено структурно-енергетичні характеристики таких комплексів та природу сил, що їх стабілізують. Таке комплексоутворення між флокаліном та цими амінокислотами в складі АТФ-чутливих калієвих мембранних каналів може розглядатися як фізичний механізм дії флокаліну як активатора цього мембранного каналу.
- Завдяки застосуванню комплексу методів, що поєднував експериментальний метод мас-спектрометрії та розрахунковий метод DFT, *in vitro* встановлені явища парного комплексоутворення та міжмолекулярної конкуренції між протималарійними артемізиніновими агентами та молекулами препаратів, що належать до класу органічних кислот (а саме, аспірину та вітаміну С), за нековалентне зв'язування з мембранними фосфоліпідами. Базуючись на отриманих результатах, запропоновано молекулярно-фізичні механізми ймовірної зміни біологічної активності цих лікарських агентів при їхньому одночасному застосуванні.
- Уперше розрахунковим методом AM1 визначено структуру гідратного комплексу дикатіону декаметоксину з 36 молекулами води та встановлено, що структура дикатіону в гідратному оточенні близька до його найбільш енергетично вигідної структури у вакуумному наближенні.

Значною перевагою дисертації Пашинської В.А., безумовно, є те, що базуючись на отриманих результатах, здобувачка дає в роботі важливі практичні рекомендації. Наприклад, застосований в роботі комбінований експериментально-теоретичний підхід на базі поєднання мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням (ІЕР) та квантово-механічних розрахунків, а також оптимізована ІЕР методика рекомендовані для практичного використання в рамках скринінгу потенційних лікарських агентів, що належать до класів

біологічно активних сполук, функціональна дія яких пов'язана з їх мембранотропною активністю.

Новизна та оригінальність представлених в роботі результатів та їх значення для національної та міжнародної науки, на мій погляд, об'єктивно підтверджується фактом їх публікації в високореєтингових спеціалізованих наукових виданнях, де статті пройшли ретельне незалежне фахове рецензування.

Все вищезазначене дозволяє мені позитивно оцінити новизну, наукову та практичну цінність дисертації Пашинської В.А. Разом з цим, в рамках наукової дискусії хотілося б задати деякі питання щодо проведених досліджень, а також висловити побажання для майбутньої роботи здобувачки:

1. Одне з запитань стосується досліджень процесу гідратації дикатіону декаметоксину напівемпіричним методом АМ1. Чим зумовлена кількість молекул води (36), що бралися для моделювання першої гідратної оболонки дикатіону?
2. Віддаючи належне дуже цікавим результатам вивчення методом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням міжмолекулярних взаємодій протималарійних артемізинінових агентів з азотними основами та кардіопротекторного агенту флокалін з амінокислотами, хотіла б запитати, чи можливо дослідити методом мас-спектрометрії взаємодії цих лікарських сполук безпосередньо з біополімерами – ДНК чи білками?
3. В якості побажань для майбутніх досліджень в рамках дисертаційної тематики хотілося б поради здобувачці продовжити вивчення фізичних механізмів взаємодії біологічно активних сполук та ліків (наприклад флокаліну) з потенційними білковими молекулами-мішенями, використовуючи інструменти молекулярного докінгу, що дозволить отримати додаткову інформацію щодо взаємодії біологічно активних лігандів з сайтами зв'язування в білках-мішенях.

Ще раз хочу підкреслити, що мої запитання та побажання ніяким чином не ставлять під сумнів достовірність наукових результатів дисертації та зроблені на їх основі висновки, а також не впливають на загальну високу позитивну оцінку дисертаційної роботи Пашинської В.А.

Враховуючи всі вищезазначені аргументи щодо актуальності тематики досліджень, обґрунтованості та новизни наукових висновків та рекомендацій дисертації, а також їх наукової цінності та значення для подальшого розвитку молекулярної біофізики, вважаю, що дисертаційна робота «Мас-спектрометричні маркери та молекулярно-фізичні механізми дії біологічно активних речовин» відповідає всім вимогам пп. 7 та 9 Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197, щодо докторських дисертацій, а здобувачка Пашинська Влада Анатоліївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 біофізика (фізико-математичні науки).

Асистент кафедри фізики функціональних матеріалів фізичного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
доктор фізико-математичних наук,
старший дослідник



Ірина ДОРОШЕНКО

Підпис Дорошенко І.Ю. засвідчую:

