

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Пашинської Влади Анатоліївни

**«МАС-СПЕКТРОМЕТИЧНІ 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-СПЕКТРОМЕТИЧНІ МАРКЕРИ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН» присвячена з'ясуванню молекулярних механізмів біологічно значущих процесів за участю біомолекул та біологічно активних речовин і виявленню мас-спектрометричних маркерів, які є індикаторами міжмолекулярних взаємодій біологічно активних сполук з їх потенційними молекулами-мішенями, насамперед, компонентами біополімерів, з частинками сольватного оточення та певними активними агентами оточуючого середовища.

Актуальність роботи зумовлена тим, що дослідження біофізичних властивостей нековалентних міжмолекулярних комплексів біомолекул, з представниками певних груп лікарських препаратів та компонентами оточення, є надзвичайно важливими як з наукової, так і з практичної точки зору. Це обумовлено їх роллю в розумінні біологічних процесів на молекулярному рівні, що визначають функціональну дію біологічно активних речовин, включаючи речовини лікарського призначення та органічні складові доквілля.

Основними процесами, що мають суттєвий вплив на різноманітні біологічні явища саме на молекулярному рівні, є міжмолекулярні фізичні взаємодії біомолекул між собою і з біологічно активними лігандами. Результати досліджень міжмолекулярних взаємодій необхідні для розуміння певних фундаментальних уявлень щодо механізмів впливу біологічно активних сполук на стан та динаміку молекулярно-біологічних систем, а також для розвитку прикладних галузей – молекулярної фармакології та медицини. Загальновідомо, що на теперішній час встановлення закономірностей взаємодії лікарських агентів із біомолекулами-мішенями є підґрунтям для спрямованого пошуку нових ефективних ліків. Одночасно, розуміння механізмів міжмолекулярної взаємодії біологічно активних компонентів доквілля є важливим для прогнозування впливу різноманітних компонентів довколишнього середовища на здоров'я та якість життя людини.

Мета дисертаційної роботи була спрямована на вирішення саме наведеної вище актуальної біофізичної проблеми – встановлення молекулярно-фізичних механізмів взаємодії молекул біологічно активних сполук, насамперед, певних лікарських препаратів, з потенційними молекулами-мішенями та молекулами оточуючого середовища. Одночасно з отриманням та аналізом результатів досліджень, які є основою дисертації, вирішується проблема визначення певних мас-спектрометричних характеристик – мас-спектрометричних маркерів, які можуть бути надійними індикаторами стосовно складу та стабільності молекулярних систем, що досліджуються.

Для досягнення поставленої мети в роботі вирішувалася комплекс *завдань, серед яких найважливішими* були систематичні мас-спектрометричні дослідження міжмолекулярних взаємодій низки лікарських речовин з потенційними молекулами-мішенями для встановлення *in vitro* механізмів їх комплексоутворення та визначення структурно-енергетичних характеристик визначених в експериментах стабільних міжмолекулярних комплексів цих лікарських агентів із біомолекулами та іншими лігандами за результатами квантово-хімічного моделювання. Для виконання цих завдань необхідно було удосконалити методики мас-спектрометричного експерименту в рамках розвитку біофізичних методів дослідження для ефективної ідентифікації мас-спектрометричних маркерів біологічно активних сполук та їх нековалентних комплексів.

Якість та адекватність отриманих результатів при виконанні завдань дисертаційної роботи гарантувалася застосуванням комплексного підходу в дослідженнях, що поєднував експериментальні методики на базі методу мас-спектрометрії з комп'ютерним квантово-хімічним моделюванням. Основними експериментальними методами, що використовувались та оптимізувались у роботі, були мас-спектрометрія з м'якими методами іонізації, а також метод тандемної мас-спектрометрії з дисоціацією, індукованою зіткненнями. В дослідженнях застосовувалося поєднання газової хроматографії і мас-спектрометрії з іонною пасткою, що дало можливість розробити нову методику ідентифікації мас-спектрометричних маркерів ряду важливих органічних компонентів оточуючого середовища та їх міжмолекулярних взаємодій. Для інтерпретації результатів, отриманих експериментально, насамперед, встановлення структури і стабільності досліджених міжмолекулярних комплексів використовувалися сучасні квантово-хімічні методи, які адекватно моделюють умови мас-спектрометричного експерименту.

Всі дослідження виконувалися в рамках відомчих та цільових наукових тем і програм Національної академії наук України (11 тем), міжнародних наукових проєктів (7 проєктів) та в рамках роботи Пашинської В.А. в якості запрошеного дослідника в Університеті міста Антверпен (Бельгія) в період з 01.10.2001 по 30.09.2003 р. за грантової підтримки «Belgium Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs».

Структура дисертації. Дисертація Пашинської Влади Анатоліївни «МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНІ МАРКЕРИ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН» є науковою працею, яка представлена для захисту як наукова доповідь за сукупністю опублікованих статей відповідно вимогам до докторських дисертацій, передбаченими Наказом Міністерства освіти і науки України №1220 від 23.09.2019 р. «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук». Одночасно всі матеріали дисертації надано у вигляді тексту, розділами якого є публікації за науковою тематикою роботи.

Дисертація складається зі Вступу, чотирьох Розділів, підрозділами яких є наукові публікації авторки (публікації у виданнях, віднесених до перших двох квартилів Q1/Q2 та до третього квартилю Q3, відповідно класифікації SCImago

Journal and Country Rank), Висновків, Переліку використаних джерел та Додатку. Обсяг дисертації становить 303 сторінки. Дисертація містить 108 рисунків, 13 схем, 35 таблиць. Список використаних джерел включає 669 посилань. Додаток містить 9 сторінок.

У Вступі надана загальна інформація про тему та завдання роботи, узагальнені результати досліджень, які стали основою дисертації.

В першому розділі представлено публікації, в яких за даними мас-спектрометричних експериментів та квантово-хімічного моделювання проаналізовано мас-спектрометричні маркери формування стабільних міжмолекулярних комплексів ряду досліджених лікарських агентів (протималярійні, антисептичні, протибактеріальні, противірусні, кардіопротекторні агенти) з їхніми потенційними біомолекулами-мішенями. На підставі всієї сукупності даних зроблено висновки щодо значної ролі міжмолекулярних взаємодій у реалізації біологічної активності, в тому числі, терапевтичної дії цих препаратів.

В другому розділі представлено результати досліджень, які спрямовані на визначення молекулярно-фізичних процесів, що відбуваються за участю ліків різних терапевтичних груп і біомолекул та можуть призводити до зміни біологічної активності цих лікарських агентів при сумісному використанні. Було розглянуто системи, що склалися з молекул ряду протималярійних або протибактеріальних ліків та молекул протизапальних або вітамінних агентів (аспірин або вітамін С), які часто застосовуються сумісно при лікуванні інфекційних захворювань.

В третьому розділі наведено результати використання м'якоіонізаційних мас-спектрометричних методик та напівемпіричного методу квантово-хімічного моделювання АМ1 для дослідження систем, що містили бісчетвертинні амонієві сполуки в водному або водно-спиртовому (етанол чи метанол) оточенні. Визначено особливості гідратації та мас-спектрометричні маркери структурної стабільності досліджених лікарських агентів та їхніх сольватних комплексів в умовах мас-спектрометричного експерименту та під впливом ряду фізичних факторів. Встановлено характеристичні мас-спектрометричні маркери структурної стабільності бісчетвертинних амонієвих агентів для ефективної ідентифікації в різних середовищах та біомедичних зразках.

В четвертому розділі приведено результати досліджень, що проводилися з метою визначення методом мас-спектрометрії біологічно активних речовин та їхніх міжмолекулярних взаємодій у складі частинок атмосферних аерозолів, що впливають на стан довкілля, здоров'я людини та відіграють суттєву роль у біосферних процесах. В цих дослідженнях застосовано розроблену в рамках дисертаційної роботи методику на основі газової хроматографії/мас-спектрометрії (ГХ/МС) для вивчення органічних полярних біологічно активних молекул та їх комплексів у складі аерозольних частинок довкілля. На підставі проведених досліджень та отриманих результатів зроблено висновок, що методика ГХ/МС має значні перспективи подальшого практичного використання для пошуку молекулярних маркерів біологічно та кліматично важливих молекулярно-фізичних процесів у довкіллі з метою прогнозування впливу

атмосферних аерозолів на рослинність, здоров'я людей і тварин та стан біосфери в цілому.

У Висновках узагальнено результати проведених досліджень і сформульовані основні висновки дисертаційної роботи.

Новизна основних результатів роботи, на мій погляд, полягає в наступному:

Визначено мас-спектрометричні маркери формування *in vitro* стабільних нековалентних комплексів молекул протималарійних агентів артемізинінового ряду з їх потенційною молекулярною мішенню Fe(III)-гемом. На основі експериментальних даних запропоновано фізичний механізм, що пов'язаний з протималарійною дією цих препаратів на молекулярному рівні, та проаналізовано залежність «структура-активність» для похідних артемізиніну.

Експериментально доведено формування стабільних нековалентних комплексів артемізиніну та дигідроартемізиніну з основами нуклеїнових кислот (аденін, цитозин та метилтимін) в полярному оточенні та запропоновано біофізичний механізм протипухлинної дії цих артемізинінових агентів на молекулярному рівні.

За допомогою комплексного підходу, який поєднував метод мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням (ІЕР) та квантово-хімічне моделювання, виявлено прояв міжмолекулярної конкуренції протималарійних артемізинінових агентів, протизапального засобу аспірин та антиоксидантного агенту вітаміну С при утворенні нековалентних асоціатів з мембранними фосфоліпідами. Також доведено формування стабільних парних комплексів молекул цих терапевтичних препаратів у полярному середовищі. Базуючись на отриманих результатах, вперше запропоновані молекулярно-фізичні механізми ймовірної модифікації функціональної активності досліджених препаратів при їх одночасному застосуванні.

З використанням оптимізованого методу мас-спектрометрії з ІЕР експериментально визначено міжмолекулярну конкуренцію при нековалентному комплексоутворенні за участю протиінфекційних бісчетвертинних амонієвих сполук та протизапального препарату аспірин, які запропоновані в якості молекулярних механізмів модифікації активності цих ліків при одночасному введенні.

Визначено мас-спектрометричні маркери для ідентифікації в біологічних та технологічних зразках двох протиінфекційних біогенних мембранотропних рамноліпідів, що продукуються бактеріями штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Встановлено, що в результаті міжмолекулярної взаємодії цих рамноліпідів та дипальмітоїлфосфатидилхоліну формуються стабільні нековалентні комплекси, які можуть впливати на функціональну активність мембранних фосфоліпідів бактеріальних клітин, визначаючи антимікробну дію цих агентів.

Методом мас-спектрометрії з ІЕР встановлено вибіркоче комплексоутворення молекули противірусного агенту тилорон з нуклеозидом уридином в полярному середовищі, та запропоновано молекулярно-фізичний механізм противірусної дії тилорону.

Ідентифіковано мас-спектрометричні маркери формування *in vitro* супрамолекулярних комплексів антибіотика циклосерин з його ймовірною

молекулою-мішенню (N-ацетил-D-глюкозамін) в складі клітинної стінки бактерій, що розглядається як молекулярно-фізична складова процесу пригнічення формування клітинної стінки бактерій, пов'язаного з протиінфекційною активністю препарату.

За даними комплексного дослідження, запропоновано молекулярно-фізичний механізм дії кардіопротекторного агенту флокалін на АТФ-чутливий калієвий мембранний канал, пов'язаний з формуванням нековалентних комплексів молекул препарату з амінокислотними залишками лізину та треоніну в складі регуляторної субодиниці цього мембранного каналу.

За результатами аналізу мас-спектрометричних маркерів, які в умовах мас-спектрометричного експерименту з ІЕР та з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією (МАЛДІ) характеризують структурну стабільність протиінфекційних агентів декаметоксин та етоній, показана роль взаємодії з іонами сольватного оточення для збереження структурної стабільності дикатіонів цих сполук та їхньої функціональної активності.

На основі методу газової хроматографії/мас-спектрометрії (ГХ/МС) розроблено методику визначення біологічно активних моносахаридних ангідридів в складі нековалентних частинок атмосферних аерозолів та вивчення їх міжмолекулярних взаємодій з іншими компонентами вторинних органічних аерозолів, які впливають на здоров'я людей та тварин.

За допомогою розробленої методики ГХ/МС в складі частинок атмосферних аерозолів виявлено органічні сполуки 2-метилтреїтол та 2-метилеритритол, які, завдяки їх активній гідратації та взаємодії з іншими полярними компонентами довкілля, вносять значний вклад в формування біологічно активних вторинних органічних атмосферних аерозолів.

Таким чином, в рамках дисертаційних досліджень на основі аналізу всієї сукупності отриманих даних мас-спектрометрії та результатів комп'ютерного моделювання методами квантової хімії запропоновано можливі молекулярно-фізичні механізми біологічної дії досліджуваних лікарських агентів. Отримані результати мають певне практичне значення і можуть бути застосованими в різних нанобіофізичних, фармакологічних, екологічних та медичних галузях.

Зауваження та запитання. Слід відзначити, що разом із вагомими здобутками робота містить певні дискусійні питання, серед яких визначено наступні:

(1) Зауваження – питання до результатів та висновків щодо методики швидкого скринінгу.

В дисертації сформульовано таке завдання (автореферат, стор.4; дисертація, стор.41): «Запропонувати методику для швидкого скринінгу нових потенційних лікарських сполук серед четвертинних амонієвих агентів та інших речовин, функціональна дія яких пов'язана з мембранотропним ефектом, базуючись на оптимізації методики на основі мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням – ІЕР»

Що таке «швидкий скринінг» та «методика швидкого скринінгу» у даному випадку? Яка саме процедура є основою швидкого скринінгу? Якщо це

«методика», з яких етапів вона складається? Що саме повинен зробити дослідник, щоб використати цю методику і у якому вигляді він отримає результати. Які саме рекомендації він може сформулювати на підставі проведення такого скринінгу. Додатково: з точки зору «швидкий скринінг». Скільки може тривати такий скринінг в реальному часі.

(2) Що мається на увазі під терміном «функціональна активність» відносно результатів вивчення властивостей різноманітних сполук, дія яких на молекулярному рівні вивчалася в рамках виконаних досліджень за темою дисертації?

(3) Що таке «фактор пригнічення функціональної активності ДНК та РНК пухлинних клітин, пов'язаний із протипухлинною дією досліджених агентів (артемізинінові агенти)»?

(4) Зауваження щодо термінології. В тексті дисертації сформульовано, що у виконаних дослідженнях застосовано «комбінований експериментально-теоретичний підхід». Дійсно, в дослідженнях застосовано комбінований підхід, але він поєднує експериментальні мас-спектрометричні методи *in vitro* та комп'ютерний експеримент *in silico*, а саме, комп'ютерні методи квантової хімії, що не є, на мою думку, теоретичним підходом. На мій погляд, теоретичний підхід припускає розробку певної теорії, за допомогою якої можна проводити певні аналітичні розрахунки, які узагальнують результати експериментів або можуть їх передбачити.

Також в роботі неодноразово використовується термін «квантово-механічні розрахунки», наприклад, «встановити структурно-енергетичні характеристики ідентифікованих у мас-спектрометричних експериментах нековалентних асоціатів молекул лікарських речовин із біомолекулами за результатами квантово-механічних розрахунків». В наукових публікаціях розрахункові методи DFT та MP2, що застосовувались в роботі, також часто називають методами квантово-хімічних розрахунків, тому б я рекомендувала використовувати цей термін по відношенню до застосованих методів.

(5) В якості рекомендацій здобувачці щодо подальших досліджень хочу порадити продовжити дослідження міжмолекулярних взаємодій біологічно активних сполук і ліків з більш складними біомолекулярними структурами, включаючи біополімери та їх функціональні комплекси, оскільки в рамках дисертації в мас-спектрометричних експериментах та комп'ютерному моделюванні з урахуванням обмежень застосованих методів досліджувалися утворення комплексів між певними біологічно активними сполуками та компонентами ймовірних біомолекул-мішеней. В більшості випадків це екладові біополімерів, такі, як гем, азотисті основи, амінокислоти, N-ацетил-D-глюкозаміном, а не безпосередньо біополімери та біомолекулярні функціональні комплекси.

Зазначу, що наведені зауваження не є принциповими, вони не стосуються основних положень та висновків дисертації, оскільки мають переважно технічний характер і не впливають на загальну високу оцінку роботи.

Публікації результатів досліджень та їх апробація. Основні наукові результати дисертації Пашинської В.А. викладено у **45 наукових працях**, з них

22 статті у провідних наукових фахових міжнародних та вітчизняних наукових виданнях, зокрема **12 статей** у журналах, віднесених до першого і другого квартилів (**Q1 і Q2**), **4 статті** – до третього квартилю (**Q3**) відповідно до класифікації SCImago Journal & Country Rank; 5 статей у наукових періодичних виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України, та 1 стаття у закордонних наукових фахових виданнях. 2 статті опубліковано без співавторів. Наукова спільнота мала можливість ознайомитися з матеріалами досліджень, покладених в основу дисертації, завдяки 23 тезам доповідей на міжнародних наукових конференціях.

Висновок. Уважно проаналізувавши матеріали публікацій за темою дисертації та її повний текст, можна зробити висновок, що отримані автором результати є значним досягненням для розвитку уявлень щодо способів визначення молекулярно-фізичних механізмів утворення стабільних міжмолекулярних нековалентних комплексів, які утворюють біологічно активні сполуки із біомолекулами та компонентами оточуючого середовища, шляхом аналізу мас-спектрометричних маркерів процесів в досліджуваних системах. В цілому, дисертація **Пашинської Влади Анатоліївни** «МАС-СПЕКТРОМЕТИЧНІ МАРКЕРИ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН» – це закінчене наукове дослідження, в якому вирішено низку принципово нових задач та отримано нові результати, необхідні для вирішення актуальної біофізичної проблеми, що мають важливе фундаментальне та прикладне значення. За своєю спрямованістю та змістом дисертація повністю відповідає паспорту спеціальності 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки).

Таким чином, за обсягом проведених досліджень, актуальністю вирішених проблем, якістю і достовірністю отриманих результатів, повнотою публікацій у наукових виданнях та їх викладення у текстах дисертації та рефераті, робота «МАС-СПЕКТРОМЕТИЧНІ МАРКЕРИ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ДІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН» відповідає всім вимогам щодо докторських дисертацій – п. 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17.11.2021 року №1197, а її автор **Пашинська Влада Анатоліївна** – заслуговує на присудження наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (фізико-математичні науки).

Доктор фіз.-мат. наук, проф.,
зав. від. біологічної фізики Інституту радіофізики
та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України

Г. В. Шестопалова

Підпис Шестопалової Г.В. засвідчую.

В.о. вченого секретаря Інституту радіофізики
та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України,
канд. фіз.-мат. наук



О. В. Кривенко

15 квітня 2024 р.