

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

ВАЩЕНКО Ольги Валеріївни

«Індивідуальні та спільні взаємодії компонентів лікарських препаратів з модельними ліпідними мембранами»,

поданої на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук

зі спеціальності 03.00.02 – біофізика

Однією з фундаментальних функцій живих організмів є їх здатність відокремлюватися від навколишнього середовища, зберігаючи при цьому певний рівень енергетичного та матеріального обміну з ним. Ця функція, покладена на біомембрани різного рівня, відбувається здебільшого за рахунок унікальних властивостей ліпідного бішару біомембран. Саме здатність ліпідної мембрани до селективної взаємодії з речовинами різної хімічної будови забезпечує базис для підтримки різниці хімічного складу внутрішньоклітинного та зовнішнього середовищ, специфіку функціонування окремих клітинних органел тощо.

Дисертаційна робота Ващенко О.В. присвячена актуальній проблемі вивчення процесів взаємодії ліпідних мембран з речовинами, які використовуються у якості компонентів лікарських препаратів. Переважна більшість сучасних компонентів лікарських препаратів належить до екзогенних речовин, для яких у організмі людини відсутні природні трансмембранні переносники. Саме тому їх доставка у клітину відбувається за рахунок дифузії крізь ліпідний бішар. Вивчення механізмів модифікації властивостей ліпідного бішару у цьому процесі уявляється дуже важливим як в аспекті їх впливу на функціонування клітини, так і в аспекті регуляції доставки лікарських речовин. У дисертаційній роботі Ващенко О.В. запропоновано біофізичний підхід до розгляду вказаної проблеми. В рамках цього підходу розглянуто фізичні процеси, які відбуваються у штучних (модельних) ліпідних мембранах при їх взаємодії з компонентами лікарських препаратів.

Актуальність теми дисертаційної роботи підтверджується великою кількістю оригінальних робіт, що виконується по цій тематиці її в різних авторитетних лабораторіях світу, а також її зв'язком з великою ланкою держбюджетних тем, серед яких «Розробка нових наноматеріалів на основі гетероструктурованих рідких кристалів і ліотропних фаз гідратованих фосфоліпідів для застосування в медико-біологічних і біофізичних дослідженнях», «Механізми надмолекулярного впорядкування та утворення нанорозмірних гетероструктур в багатокомпонентних рідкокристалічних системах і створення нових функціональних матеріалів на їх основі», «Вплив біологічно важливих молекул та іонного середовища на фазовий стан модельних ліпідних мембран», «Зміни структурно-функціональних властивостей модельних біомембран за індивідуальної та сукупної дії лікарських субстанцій», «Вивчення

мембранотропної дії лікарських субстанцій», «Специфіка відгуку ліпідного наноматеріалу на присутність люмінесцентних зондів та біологічно активних субстанцій», «Визначення взаємодії наноносіїв фармпрепаратів з модельними фосфоліпідними мембранами», «Біофізичні моделі молекулярної взаємодії граміцидину S» та ін.

Дисертаційна робота складається зі вступу, семи розділів та висновків. У **вступі** обгрунтовано актуальність проблеми, обраної для дослідження, його мета та задачі, сформульовано наукову новизну отриманих результатів та їх практичне значення, а також охарактеризовано особистий внесок та публікації здобувача.

Розділ 1 присвячено літературному огляду сучасних уявлень щодо фізичних властивостей ліпідного бішару та методів їх дослідження. Наведено літературні дані стосовно взаємодій модельних ліпідних мембран з лікарськими речовинами і проаналізовано ефекти спільної взаємодії двох речовин з ліпідною мембраною. На основі огляду даних літератури обгрунтовано мету дисертаційної роботи.

У **розділі 2** охарактеризовано речовини, що використовувалися у роботі. Це більше 40 лікарських речовин та їх компонентів, а також 7 видів ліпідів, які, у різних комбінаціях, були застосовані для виготовлення модельних ліпідних мембран. Модельні ліпідні мембрани, застосовані у дослідженні, становлять мультибішарові водні дисперсії з орієнтаційним типом впорядкування. Також в цьому розділі охарактеризовано експериментальні та теоретичні методи дисертаційного дослідження, серед яких диференціальна скануча калориметрія, малокутове рентгенівське розсіювання, Фур'є-ІЧ-спектроскопія, квантово-хімічне моделювання та ін.

У **розділі 3** наведено результати дослідження модельних ліпідних мембран із вмістом індивідуальних лікарських речовин та їх окремих структурних компонентів, у тому числі іонів. Аналізується взаємодія речовин з різними компартментами ліпідної мембрани. Висвітлено випадки утворення додаткової термодинамічної фази ліпідів, а також ефекти суперпозиції мембранотропної дії окремих структурних складових досліджуваних речовин. Отримані результати проаналізовано в аспекті зв'язку молекулярних параметрів речовин та змін термодинамічного стану модельних ліпідних мембран. Локалізації речовин у мембрані визначається переважно їх хімічною будовою та коефіцієнтом ліофільності. Показано, що ефекти взаємодії з мембраною якісно та кількісно залежать від поверхневої щільності заряду (при взаємодії з поверхнею мембрани) та від конформаційної рухливості та коефіцієнта молекулярної анізотрії (при взаємодії з об'ємом мембрани). Показано, що мембранотропна дія речовин в цілому становить суперпозицію мембранотропної дії їх гідрофільних та гідрофобних структурних складових.

У розділі 4 проведено узагальнення отриманих експериментальних даних, на підставі якого запропоновано класифікацію ефектів мембранотропної дії, показано спільність цих для обох типів взаємодії речовин з мембраною, розглянутих у розділі 3. Висвітлено загальні механізми мембранотропної дії речовин. Показано, що залежність мембранотропного ефекту від ліпофільності уведеної речовини має екстремум в області середніх значень ліпофільності. Проведено кореляційний аналіз спостережуваних ефектів мембранотропної дії та молекулярних параметрів речовин. На підставі цього аналізу встановлено, що визначальними молекулярними параметрами лікарських речовин при їх взаємодії з мембраною є також молекулярний об'єм, дипольний момент та частка полярної поверхні молекули. Представлено феноменологічну математичну модель, яка описує взаємодію з ліпідною мембраною космотропних та хаотропних гідрофільних сполук, що спричиняють якісно різні мембранотропні ефекти (відповідно, ущільнення або розрідження мембрани). Простежено зв'язок між мембранотропною дією досліджених речовин та їх функціонуванням у живих організмах.

У розділі 5 розглянуто різноманітні випадки спільної дії компонентів лікарських препаратів при їх одночасній взаємодії з мембраною. Дано розгляд випадків спільної взаємодії з мембраною катіонів та аніонів у складі водорозчинних солей, катіонів різної природи, речовин з різною локалізацією у мембрані, лікарських та допоміжних речовин фармпрепаратів тощо. Більшість багатокомпонентних систем у цьому розділі проаналізовано за допомогою методу квазібінарних фазових діаграм. Це дозволило виявити ефекти модуляції мембранотропної дії однієї речовини у присутності іншої та встановити стехіометрію утворюваних ними сполук або комплексів (якщо це мало місце). Для характеристики та кількісного порівняння отриманих ефектів запропоновано класифікацію ефектів спільної мембранотропної дії в категоріях синергізму, антагонізму, адитивності та конкуренції. Усі вказані випадки спільної мембранотропної дії спостережено експериментально. Показано, що ефекти спільної дії можуть проявлятися незалежно від взаємної локалізації речовин у бішарі, та характеру їх індивідуальної мембранотропної дії. Запропоновано методологію (при використанні методу диференціальної скануючої калориметрії) порівняння мембранотропної дії лікарських препаратів-аналогів, а також виокремлення внеску у мембранотропну дію допоміжних речовин лікарських препаратів. Встановлено модулювальний потенціал мембранотропної дії допоміжних речовин у складі лікарських препаратів зі збереженням основного характеру мембранотропної дії лікарської речовини. Проведено класифікацію спостережуваних ефектів спільної мембранотропної дії та визначено низку механізмів спільної взаємодії речовин з ліпідними мембранами.

Розділ 6 присвячено висвітленню впливу ліпідного складу мембран на їх взаємодію з компонентами лікарських препаратів. Використано 5 різних композицій модельних ліпідних мембран, які наближаються до складу окремих видів клітин або клітинних органел. Наведено результати порівняння мембранотропної дії низки лікарських та допоміжних речовин фармпрепаратів у ліпідних мембранах різного складу. Були використані традиційні (антибіотик граміцидин S, протизапальний засіб фенспірид, адсорбент каолін), і новітні (антиметаболіти кон'югати метотрексату та бетулонової кислоти, наноносії фармпрепаратів декстран-поліакриламідні кополімери) компоненти лікарських препаратів. Встановлено, що варіації ліпідного складу можуть кардинальним чином змінювати взаємодію компонентів лікарських речовин з мембраною. При цьому однакові ефекти (наприклад, латеральний перерозподіл ліпідів) можуть бути викликані зв'язуванням речовини як з поверхнею, так і з об'ємом бішару. На підставі даних, отриманих для граміцидин S у присутності холестерину, запропоновано механізм спільної мембранотропної дії, пов'язаний з продукуванням вільного об'єму у мембрані.

У **розділі 7** отримано низку кінетичних характеристик модельних ліпідних мембран та процесів їх взаємодії з компонентами лікарських речовин. Зокрема, показано, що розмір кооперативного домену ліпідів у мембрані має гіперболічну залежність від швидкості термосканування при калориметричному експерименті. Це дозволило провести оцінку максимального граничного розміру кооперативного домену, існування якого вказує на первинну неоднорідність моноліпідної мембрани. Викладено феноменологічну математичну модель, яка описує вплив неоднорідності ліпідної мембрани на її проникність для лікарських речовин. Показано, що, в залежності від потенціалу взаємодії, виникнення неоднорідності може як сприяти, так і запобігати пасивній дифузії речовин крізь ліпідний бішар. Експериментально показано зміну кінетичних характеристик взаємодії двох лікарських речовин з ліпідною мембраною (протівірусної речовини тилорону та протизапальної речовини диметилсульфоксиду) в залежності від порядку їх уведення до мембрани. Це пояснюється одночасним перебігом двох процесів, конкурентної сорбції вказаних речовин на мембрані та впливом диметилсульфоксиду на трансмембранну дифузцію тилорону за механізмом виникнення неоднорідності. Також у цьому розділі авторка окреслює перспективи подальшого розвитку робіт в напрямку вивчення взаємодій компонентів лікарських препаратів з модельними мембранами. На її думку важливими є з'ясування взаємозв'язку між термодинамічними й структурними параметрами ліпідних мембран та їх функціонуванням у живому організмі, вивчення латерального фазового розділення ліпідів та його біологічної значущості і розробка комплексного експериментально-аналітичного підходу, важливого для оптимізації дії лікарських препаратів.

В цілому у дисертаційній роботі О.В. Ващенко вирішено важливу наукову проблему, пов'язану з висвітленням механізмів та впливових молекулярних параметрів взаємодії ліпідних мембран з компонентами лікарських препаратів. Запропонований в дисертаційній роботі біофізичний підхід, в основу якого покладено специфічні властивості ліпідного бішару, дозволив авторці узагальнити та узгодити великий масив накопичених на сьогодні експериментальних даних, отриманих різними методами, та сприяв встановленню низки механізмів індивідуальної та спільної взаємодії речовин з ліпідними мембранами. Достовірність результатів дисертаційної роботи підтверджується узгодженням отриманих даних між собою та з численними літературними даними.

Вдалою з методичної точки зору є розглядання випадків взаємодії речовин окремо з гідрофільною поверхнею мембрани та її гідрофобним внутрішнім об'ємом, яке дає змогу виокремити принципово різні механізми взаємодії та водночас довести спільність ефектів, що виникають у системі. Дуже важливими та перспективними уявляються дослідження спільної взаємодії лікарських речовин з мембраною, взаємодії ліпідних мембран з різними типами дисперсних мінералів, а також кінетичні дослідження.

При загальній позитивній оцінці роботи, у мене є наступні зауваження:

- 1) Стор. 21. В рівнянні (1.1) $v/a = 1/3$ є друкарська помилка (об'єм/площа = довжина). Для критичної умови виникнення сфер ми маємо $v/a_0 l_c = 1/3$ (Israelachvili, J.; Mitchell, D. & Ninham, B. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 1976, 72, 1525-1568. Варто було написати, що l_c це максимальна довжина (length of the extended acyl chain).
- 2) Стор. 27. рис. 1.5, що цитується по роботі Coster, H. The physics of cell membranes Journal of Biological Physics, Springer, 2003, 29, 363-399. приведено без необхідних пояснень величин a і γ_{wo} . Чому дорівнює рівноважна середня площа ліпідної молекули у бішарі? Ці пояснення є в оригінальній роботі.
- 3) Стор. 29-30. незрозуміло про який параметр порядку йде мова на рис. 1.8 і 1.9 (трансляційний (просторовий), конформаційний чи орієнтаційний). Як вони визначені? Стор. 35 незрозуміло про який параметр «параметр впорядкованості алкільних ланцюгів» йде мова.
- 4) Стор. 35. Незрозумілим є твердження про те що «Структура води на поверхні мембрани більш компактна, ніж у чистій воді.» Насправді у роботі Stern, H. A. & Feller, S. E. Calculation of the dielectric permittivity profile..., American Institute of Physics, 2003, 118, 3401-3412. показано, що діелектрична проникність в міжфазній області вища, чим в об'ємній воді.

- 5) В роботі є ряд описок, наприклад: Стор. 22. близько, стор. 27 моншар, стор. 35 ліпідів, стор. 140 Виокремлені і т.д.
- 6) В роботі є ряд невдалих формулювань або незрозумілих тверджень, наприклад:
 - a. Стор. 14 «Нарешті, модельні фосфоліпідні мембрани є ліотропними рідкими кристалами...»
 - b. Стор. 33. «Різноманіття структур та форм ліпідів покликане підтримувати належне функціонування мембрани у широких межах зовнішніх умов».
 - c. Стор. 40 «виявлена багаторазова різниця»
 - d. уявною енергією активації (apparent activation energy-рос. кажущийся) краще написати ефективною...
 - e. Стор. 46. «Для мембран з цвіттеріонних ліпідів використовують також бідистильовану воду.»
 - f. Для вирішення проблеми взаємодії ЛР та ліпідного середовища використовуються різноманітні біофізичні методи: математичне та квантово-хімічне моделювання...
 - g. Стор. 70. «Температура основного фазового переходу (T_m) – комплексний параметр, пов'язаний з електронною та геометричною структурою» → Краще, температура може залежати від різних факторів, таких як ...
 - h. Стор. 85. «Хімічна будова речовини визначає її розташування у мембрані, яке обумовлює взаємодію з її гідрофільною поверхнею, гідрофобним об'ємом чи гідрофільно-гідрофобним інтерфейсом.»
 - i. Стор. 86. «Водночас іони є необхідними учасниками життєзабезпечення клітини, а також широко застосовуються як компоненти харчових домішок та буферних розчинів.»
 - j. Стор. 122. «...що при взаємодії мембрани з унесеними до неї речовинами змінюються, власно, об'єми відповідних частин, втім для фазового стану ліпідів мають значення латеральні взаємодії (Рис. 1.5, с. 27) – тож, можна обмежитись розгляданням площ перетину ліпідних молекул.»
 - k. Стор. 193. «...проведена кількісна характеристика станів води у водних розчинах ЛР та мембранах із вмістом ЛР дозволяє виявити такі зміни: а) у ліпідній мембрані порівняно з водою; б) ліпідному та водному середовищі при додаванні ЛР; в) викликані присутністю ЛР у складі ЛП.»
- 7) Стор. 72. «2.2.5. Напівширина» → «2.2.5. Напівширина піку переходу»
- 8) В роботі використовуються несистемні і системні одиниці, наприклад: Å (Стор. 24,32,38, 46,95,112), нм (Стор. 28), μ , Д (стор. 218).
- 9) Стор. 49. Що таке є «поверхнева щільність заряду»?
- 10) Стор. 80. Формула 2.20 (Кувшиннікова?) є простим кінетичним рівнянням 1 порядку.
- 11) Стор. 102 і далі стор 163 (спільна дія) . При обговоренні впливу ДМСО та тілорону, та їх спільної дії варто було б обговорити дані з врахування відомих моделей параметрів розчинності (наприклад Хансена та інші) в яких враховані внески різних взаємодій.
- 12) Стор. 164. Відсутність та присутність змін морфології еритроцитів з рис. 5.14 і Рис. 5.15 не є очевидною.

На загальну позитивну оцінку дисертаційного дослідження Вашенко О. В. ці зауваження суттєво не впливають, оскільки вони мають переважно дискусійний характер та певну основу для подальшого дослідження теми, а деякі з них є суто технічними.

Результати, представлені в дисертації, у повному обсязі викладені у 47 публікаціях, з яких 6 статей у вітчизняних фахових виданнях, 4 статті у вітчизняних виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS, 12 статей у зарубіжних спеціалізованих виданнях, 3 статті, які додатково відображають наукові результати дисертації, а також 22 тези доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях. Представлені здобувачем результати є новими та оригінальними, а сформульовані у дисертації висновки – науково обґрунтованими.

Вважаю, що за ступенем актуальності проблеми, новизни та практичної значущості отриманих результатів, обґрунтованості висновків, а також особистого внеску здобувача дисертаційна робота «Індивідуальні та спільні взаємодії компонентів лікарських препаратів з модельними ліпідними мембранами» повністю відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. зі змінами, а її авторка, Ващенко Ольга Валеріївна, заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

доктор фізико-математичних наук, професор,

завідувач відділу фізичної хімії

дисперсних мінералів

Інституту біоколоїдної хімії

імені Ф.Д. Овчаренка НАН України

М.І. Лебовка

Власноручний підпис професора Лебовки М.І. підтверджую

кандидат хімічних наук, учений секретар

Інституту біоколоїдної хімії

імені Ф.Д. Овчаренка НАН України



О.Ю. Войтенко