

Відгук отриманий 26.07.2021р.

Голова спеціалізованої вченої ради ДФ 64.051.18

ВІДГУК

Баранник Євген

опонента, завідувача відділу низькотемпературного консервування Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, доктора фізико-математичних наук, професора Гордієнко Ольги Іванівни на дисертаційну роботу Тарабари Уляни Костянтинівни «Спектроскопічне та молекулярно-динамічне дослідження фібрилярних агрегатів білків», представленої на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 10 – Природничі науки за спеціальністю 105 – Прикладна фізика та наноматеріали

Актуальність теми дисертації

Дисертація Тарабари Уляни Костянтинівни присвячена дослідженню високовпорядкованих білкових агрегатів, так званих амілоїдних фібрил, які дедалі більше привертають увагу дослідників у двох основних аспектах, пов'язаних із: 1) встановленням кореляції між накопиченням амілоїдів у різних органах і тканинах та розвитком низки нейродегенеративних захворювань та інших патологій, таких як системний амілоїдоз та діабет другого типу; 2) можливістю застосування амілоїдних фібрил у нанотехнологічному аспекті завдяки їх перевагам над синтетичними полімерами, таким як біосумісність, висока гнучкість, термостабільність, здатність до біодеградації, тощо.

На сьогодні, використання специфічних флуорохромів є одним із найбільш розповсюджених методів детектування фібрилярних агрегатів білків. Крос- β -листовий остов фібрили, у якому β -листи розповсюджуються вздовж довгої осі фібрили, а окремі β -тяжі розташовуються у перпендикулярному напрямку, створює унікальний структурний мотив для зв'язування малих молекул. Однак, незважаючи на інтенсивні дослідження амілоїдної специфічності різних класів флуорохромів, пошук нових барвників, які б мали високий квантовий вихід у присутності фібрил, незначну спорідненість до нативного білка, низьку цитотоксичність, спектральний відгук в області «оптичного вікна» біологічних тканин, де майже відсутній вплив комбінаційного та релєївського розсіяння, а також власної флуоресценції досліджуваних біомакромолекул, є критично важливим. Іншою фундаментальною проблемою при вивченні таких супрамолекулярних структур є з'ясування механізмів фолдингу білка в унікальну функціональну просторову структуру та дослідження передумов та рушійних сил місфолдингу, в ході якого формуються фібрилярні білкові агрегати.

З огляду на вищезазначене, розв'язані в дисертаційній роботі задачі, а саме, дослідження зв'язування довгохвильових ціанінових барвників з амілоїдними фібрилами лізоциму та інсуліну методами абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії, розробка нової тест-системи на основі каскадного Фьорстерівського резонансного переносу енергії на фібрилярній матриці та молекулярно-динамічне моделювання амілоїдогенних мутантів білків з метою визначення детермінантів

процесу місфолдингу, є, безумовно, актуальними як із фундаментальної, так і прикладної точок зору.

Обґрунтованість наукових положень і висновків, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота складається із анотації, переліку скорочень, умовних позначень та термінів, вступу, п'яти розділів, загальних висновків та списку використаних джерел наукової літератури, що налічує 468 найменувань, повний обсяг роботи становить 262 сторінки.

Перший розділ містить огляд наукової літератури за темою дисертації, в якому наведені основні результати, отримані дослідниками стосовно процесу фібрилогенезу та можливостей нанотехнологічного застосування амілоїдних фібрил, розглянуті існуючі на даний момент методи детектування фібрилярних агрегатів та відомості про особливості амілоїдної трансформації досліджуваних у роботі білків, обґрунтовано вибір теми дослідження.

У другому розділі детально описано об'єкти дослідження, методики приготування зразків, збору, обробки та аналізу даних, які були отримані в ході експериментів як *in vitro*, так і *in silico*.

У третьому розділі проведена оцінка амілоїдної чутливості нових ціанінових барвників за допомогою методів абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії за умов самоасоціації барвників у водному середовищі. Для врахування цієї особливості, що ускладнювала аналіз барвник-білкової взаємодії, у роботі була проведена деконволюція спектрів, яка дозволила розділити вклади різних форм барвника у загальний спектр; та запропонована адекватна модель агрегаційної поведінки гептаметинів у присутності амілоїдних фібрил. Продемонстрована здатність барвників розрізняти мономерний та фібрилізований стани білкової молекули, визначені можливі сайти зв'язування.

Четвертий розділ присвячений дослідженню переносу енергії в каскаді з чотирьох флуорофорів на матриці амілоїдних фібрил, що може бути застосовано як альтернативний метод детектування фібрилярних агрегатів, а також слугувати підґрунтям для розробки пристроїв на основі білкових самоасоціатів в нонофотоніці.

У п'ятому розділі проведено молекулярно-динамічне моделювання амілоїдних мутантів білків, визначено вплив точкових, подвійних та потрійних мутацій на структуру та динаміку поліпептидного ланцюга.

Висновки, зроблені автором на основі аналізу значного фактичного матеріалу, є обґрунтованими та статистично достовірними, мають велике теоретичне та практичне значення.

Наукова новизна дисертаційної роботи

У дисертаційній роботі було вперше досліджено процеси зв'язування нових представників двох класів ціанінових барвників з мономерними та фібрилярними білками, на основі чого дані барвники були рекомендовані як потенційні амілоїдні маркери; вперше здійснено дизайн каскаду із чотирьох хромофорів, що забезпечує

зсув максимуму випромінювання в область «оптичного вікна» біологічних тканин, являє собою нову тест-систему для визначення амілоїдів, а також може знайти подальший розвиток у нанофотоніці; вперше проведено молекулярно-динамічне моделювання значної кількості амілоїдогенних мутантів лізоциму та інсуліну, та визначено вплив мутацій на низку інтегральних та локальних параметрів поліпептидного ланцюга.

Повнота викладу основних результатів дисертації в публікаціях здобувача

Основні результати дисертаційної роботи у повному обсязі опубліковано в 8 статтях, з них 3 статті у фахових виданнях України, 1 стаття у фаховому виданні України, що індексується в наукометричній базі SCOPUS, 3 статті у періодичних наукових виданнях Великої Британії та Нідерландів, що входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS, та одна стаття, яка додатково відображає наукові результати дисертації.

Відповідність вимогам академічної доброчесності

Наведені в дисертації результати є новими, робота не містить запозичених висновків інших авторів без належних посилань на їх дослідження, що відповідає вимогам академічної доброчесності.

Зауваження

- 1) У розділі 2 зазначено, що для деконволюції використовувалась асиметрична лог-нормальна функція, однак не вказано, чому було обрано саме таку функцію, а не, наприклад, звичну функцію Гаусса. Окрім цього, у розділі 3 проводилась деконволюція спектрів поглинання, однак з тексту даного розділу не зовсім зрозуміло, чому спектри флуоресценції барвників не аналізувались подібним чином.
- 2) При аналізі результатів роботи, викладених у розділі 4, автор оперує такими поняттями як «волога» та «суха» поверхня амілоїдних фібрил. Якщо про «сухий» зіппер фібрилярних білків трохи згадується на стор. 42, то що таке «волога» поверхня, не зовсім зрозуміло з тексту дисертації.
- 3) Розділ 5 присвячений викладенню результатів молекулярно-динамічного моделювання амілоїдогенних мутантів лізоциму та інсуліну. На мій погляд, недостатньо уваги приділено порівнянню отриманих у цьому розділі даних із наявною у фаховій літературі інформацією щодо аналогічних досліджень. Можливо, варто було б у огляді наукової літератури присвятити невеликий підрозділ цьому питанню.
- 4) У таблиці 5.1 не вказано, в яких одиницях розрахований час руйнування елементів вторинної структури білка.
- 5) Робота містить незначні технічні недоліки. Наприклад, розмір символів, якими подані формули, менший за розмір тексту.

Однак, зазначені зауваження не знижують вагомості отриманих наукових результатів та не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Загальний висновок

На підставі вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота «Спектроскопічне та молекулярно-динамічне дослідження фібрилярних агрегатів білків» задовольняє вимогам, що передбачені наказом «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 р. № 40 зі змінами та постановою «Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії» Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 р. № 167 зі змінами, а її авторка, Тарабара Уляна Костянтинівна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 10 – Природничі науки за спеціальністю 105 – Прикладна фізика та наноматеріали.

Опонент

Завідувач відділу
низькотемпературного консервування
Інституту проблем кріобіології
і кріомедицини НАН України,
доктор фізико-математичних наук, професор

Ольга ГОРДІЄНКО

Підпис Гордієнко О. І. засвідчую:

