

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
АВЕРЧЕНКО Катерини Андріївни
«Механізми впливу редоксактивних наночастинок ($\text{ReVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ і $\text{CO}_2\text{-x}$)
на біоенергетичні процеси в мітохондріях»,
представлену на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук
за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Дисертаційна робота Аверченко К.А. присвячена вельми актуальній біофізичній проблемі встановлення механізмів впливу редоксактивних наночастинок (НЧ) на основі рідкоземельних елементів (РЗЕ) на такі показники активності мітохондрій клітин печінки як мітохондріальний потенціал, процеси дихання та окислювального фосфорилування. **Актуальність** обраної теми не викликає сумніву, бо очікувані результати становитимуть складову фундаментальних основ застосування сучасних наноматеріалів, що розробляються, зокрема наночастинок, у фармакології, біомедицині та подальших нанобіофізичних дослідженнях. Для дослідження обрано фізичні процеси, які відбуваються при функціонуванні такого біологічного об'єкту як мітохондрії, які є «енергетичними станціями» живих клітин; вплив на ці процеси може спричинитися НЧ, які мають окислювально-відновлювальні (редокс) властивості. Практично важливими результатами такого впливу є захисна антиоксидантна дія або, навпаки, пошкоджуюча оксидативна дія при фотодинамічній терапії. Встановлення напрямку та рівня (інтенсивності) такої дії в залежності від складу, розміру, форми, концентрації НЧ є важливим завданням.

Про актуальність роботи свідчить також її **зв'язок з державними науковими програмами** у рамках НДР «Багатофункціональні нанолюмінофори для біомедичних застосувань» (2009-2010 рр., номер держреєстрації № 0109U005914), «Розробка нових люмінесцентних матеріалів для застосування в нанобіотехнологіях» (2011-2012 рр., номер держреєстрації № 0111U008840), Державної цільової науково-технічної та соціальної програми «Наука в університетах», НДР «Розробка методів отримання багатофункціональних люмінесцентних наноструктур для технічних і біомедичних застосувань» (2010-2011 рр., номер держреєстрації № 0110U006970), НДР «Розробка технологій отримання гібридних органіко-неорганічних наноструктурованих люмінесцентних матеріалів» (2012-2016 рр., номер держреєстрації № 0112U001897).

У відповідності з вимогами, дисертація складається зі вступу, п'яти розділів, висновків та списку використаних джерел.

У вступі наведено всі необхідні формальні відомості.

У першому розділі, що є літературним оглядом, розглянуто сучасний стан проблеми впливу редоксактивних НЧ на процеси в біосистемах. Проаналізовано дані стосовно токсичних та захисних властивостей НЧ на основі РЗЕ, їх вплив на механізми генерації активних форм кисню та вільних радикалів. Відмічено можливі біомедичні використання НЧ.

У другому розділі надано опис експериментальної техніки та методики досліджень. Слід зазначити, що для всебічного розгляду очікуваних ефектів у абіотичних та біотичних системах різного рівня складності було застосовано великий набір відповідних експериментальних методів, таких як спектроскопія поглинання та хемілюмі-

несценції, мікрофлуориметрія та мікроспектроскопія, метод динамічного розсіювання світла, просвічуюча електронна мікроскопія. Також використано методики калориметричного МПТ-тесту для оцінювання виживання клітин, визначення загальної антиоксидантної активності, полярографічного вимірювання дихання і окисного фосфорилування мітохондрій. Для аналізу даних була використана обчислювальна кінетична модель Маркевича і Хоска.

Описано методи синтезу НЧ, методики отримання клітин гепатоцитів печінки та клітинних органел – мітохондрій. Важливо, що дослідження з біоб'єктами проводили згідно з вимогами «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях».

Третій розділ присвячено опису досліджень здатності НЧ на основі РЗЕ інактивувати вільні радикали в модельних системах.

Слід зазначити вдалий вибір автором серії модельних систем зі зростаючим рівнем складності, починаючи від абіотичної системи, яка містила реактив Фентона, далі молекулярної система з ліпопротеїдами яєчного білка і, нарешті, біотичних систем з органелами – мітохондріями та клітинами печінки. Для всіх цих систем виявлено різний характер дії НЧ $\text{ReVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ і CO_2 у залежності від їх складу та розмірів.

На погляд рецензента, вельми важливим є висновок про те, що вплив НЧ на генерацію вільних радикалів у абіотичних та біотичних системах може відрізнятися, що вказує на необхідність ретельного вибору модельних систем та запобігання прямого перенесення результатів для абіотичних систем на системи з живими клітинами.

Отримані результати також підтверджують, що саме мітохондрії є основною мішенню для про- або антиоксидантної дії редоксактивних НЧ досліджуваних типів.

Вельми цікавим є моделювання зміни редокс-балансу у системах, де формуються комплекси НЧ з редоксактивним барвником метиленовим блакитним, який застосовується у фотодинамічній терапії. Очікується, що комбінація барвника з НЧ може посилити терапевтичний ефект.

Також практично важливою є інформація стосовно можливої агрегації наночастинок, які проникли у клітину, з формуванням більших агрегатів. Для таких відносно великих (по відношенню до розміру клітини) агрегатів змінюється механізм дії: замість хімічних реакцій стає можливим просте механічне пошкодження клітини, подібне до пошкодження кристалами льоду, які вивчаються у рамках дисципліни кріобіології.

Наступним кроком досліджено поведінку НЧ у присутності протекторної речовини – глутатіону – у його відновленій та окисненій формах (GSH/GSSG) та виявлено ключову роль GSH у регуляції інтенсивності генерації вільних радикалів за участю наночастинок.

У четвертому розділі розглянуто вплив НЧ на мітохондріальний потенціал, процеси дихання та окислювального фосфорилування, в результаті чого сформульовано механізми впливу НЧ на мітохондріальні процеси.

У якості основного експериментального методу, який дозволяє виявляти здатність НЧ впливати на генерацію або інактивацію активних форм кисню та вільних радикалів, автором обрано активовану хемілюмінесценцію. Для дослідження локальних змін мембранного потенціалу на рівні окремих клітин застосовано флуоресцентний зонд –

ліпофільний катіон JC-1, утворення J-агрегатів якого залежить від інтактності мітохондрій.

Встановлено, що експозиція клітин з НЧ призводить до зниження флуоресценції J-агрегатів, що вказує на порушення мітохондріальної активності. Зниження мембранного потенціалу під впливом НЧ корелює з пригніченням процесів дихання і окислювального фосфорилування в ізольованих мітохондріях. Показано, що пригнічуючий ефект ортованадатних НЧ може визначатися впливом іонів, які вивільняються з поверхні НЧ, а ефекти малих частинок CeO_{2-x} можуть бути зумовлені утворенням комплексів з фосфатами.

Із застосуванням кінетичної моделі, запропонованої Маркевичем і Хоеком, виконано розрахунки продукції супероксидного радикалу у ланцюзі транспорту електронів. Запропоновано модель механізмів дії НЧ на біоенергетичні процеси в мітохондріях, які включають інгібування транспорту електронів НЧ і активацію утворення супероксиду та перекису водню, інтеграцію НЧ в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів електронів, та накопичення НЧ у внутрішньоклітинних структурах.

П'ятий розділ присвячено встановленню впливу НЧ на мітохондріальний потенціал гепатоцитів щурів різного віку.

Ці дослідження представляються дуже важливими не тільки у рамках вивчення НЧ, а й для більш широкої проблематики особливостей застосування фармакологічних препаратів у осіб різного віку. З практичної точки зору також важливо, що розроблено методику тестування таких вікових особливостей на модельних системах.

Експериментально показано, що клітини старих тварин є більш чутливими до прооксидантної дії НЧ. У клітинах молодих щурів при сумісній дії прооксидантів і НЧ відбувається стабілізація мембранного потенціалу, а для старих тварин цей ефект відсутній.

У цілому, дисертація виконана на високому науковому рівні і свідчить про високу фахову та кваліфікаційну підготовку здобувача. Основні положення і результати, представлені в дисертації, є **новими**, вперше отриманими автором. Так, вперше встановлено, що у різних модельних системах НЧ на основі РЗЕ проявляють про- або антиоксиданту активність в залежності від їх фізико-хімічних параметрів, властивостей мікрооточення та експериментальних умов. Експериментально встановлено відмінності у механізмах проникнення НЧ в клітини: малі НЧ проникають за механізмом адсорбції-дифузії, а більші за розміром – шляхом ендоцитозу. Вперше встановлено безпосередній прооксидантний вплив НЧ на біоенергетичні процеси в мітохондріях. Вперше встановлено відмінності у впливі НЧ у залежності від віку експериментальних тварин. Запропоновано механізми впливу НЧ, що досліджувалися, на редокс-процеси в мітохондріях.

Усі наукові положення та висновки дисертації є **обґрунтованими** завдяки повноті отриманих експериментальних і розрахункових даних та їх порівнянню з результатами досліджень інших авторів.

Достовірність результатів не викликає сумніву, оскільки вони отримані з використанням надійних експериментальних методик, ретельно оброблені та проаналізовані.

Основні результати, наведені у роботі, вчасно і повністю **опубліковані** у 7 статтях у фахових наукових вітчизняних та міжнародних журналах та у 9 тезах доповідей. Робота пройшла ретельну **апробацію** на багатьох національних та міжнародних наукових конференціях.

Тема та зміст дисертації **відповідають спеціальності** 03.00.02 – біофізика.

Автореферат вірно відображає зміст дисертації.

Текст дисертації та автореферат добре написані, гарно ілюстровані та оформлені.

Тим не менш, робота не позбавлена деяких **недоліків**.

1. В тексті роботи та в авторефераті треба було дати чітке визначення біотичних та абіотичних систем, що досліджувалися в роботі, та навести їх конкретний склад.
 2. У зв'язку з попереднім зауваженням виникає питання стосовно віднесення системи, описаній на стор. 58 (а також Рис. 3.2) як: «...в біотичній модельній системі, яка не містить клітинний матеріал, а містить ліпопротеїни яєчного жовтка...». Якщо в системі нема живих клітин, а є тільки певна органічна сполука, то це просто середовище для біохімічних реакцій, а не біологічна система.
 3. Вищеозначена невизначеність у термінології викликає протиріччя між назвою підрозділу 3.1 «Редоксактивність наночастинок в модельних абіотичних і біотичних системах» (стор. 56) та загальним висновком (стор. 77): «В даному розділі було викладено вплив наночастинок ... в модельних біосистемах різної складності.»
 4. Формулювання висновку 2 до розділу 4 (стор. 100) «Особливості взаємодії НЧ з клітинами і ізольованими МХ обумовлені розмірами і формою частинок» не є точним, бо у роботі експериментально досліджувалася лише залежність взаємодій від розміру НЧ, а кількісні дані стосовно форми не отримували. Так, НЧ CeO_{2-x} мали сферичну форму незалежно від їх розміру (стор. 39), а три види НЧ ортованадатів різного розміру мали різну форму (сферичну, веретеноподібну та стрижнеподібну), що не дозволяє відокремити ефекти розміру та форми.
 5. Бажано було б давати більш розгорнуті підписи до рисунків з основними результатами, зокрема вказувати, залежності яких параметрів наводяться. Наприклад, у підпису до Рис. 4.10 «Вплив НЧ на швидкість субстратного дихання в стані V_2 » треба було б уточнити, що йдеться про процес споживання кисню у мітохондріях та пояснити значення параметру, показаного по осі ординат: «натом O_2 / хв.мг білка». Аналогічне зауваження відноситься до підписів до Рис. 4.11, 4.12.
 - У підпису до Рис. 4.4 бажано б було вказати, яким методом та яким чином отримано флуоресцентні профілі гепатоцитів.
 - У підпису до Рис. 4.6 додати «(контроль)» - «... в присутності або у відсутності (контроль) НЧ ».
 6. У списку реактивів (стор. 55) відсутнє походження препарату метиленового блакитного, взаємодії якого з наночастинами присвячено підрозділ 3.2.
 7. Стор. 88, Рис. 4.8 та коментар до нього. З тексту не ясно, що вважалося за «контроль»?
- «Пригнічення мітохондріальної функції під впливом НЧ розмірами ... спостерігалось лише на 3 год експерименту» - мабуть, треба було сказати «Сильне» або «Помітне» пригнічення, бо і на першій годині значення потенціалу, судячи з гістограми, нижче 100% від контролю.

Що мається на увазі під «енергізацією мембрани МХ»?

8. Також присутня низка неточностей в тексті роботи, наприклад:

- стор. 4-5, «Список умовних позначень». Зазвичай скорочення наводяться у алфавітному порядку спочатку українською, а потім іноземною мовами. У скороченнях «РЗЭ» та «ЭДТА» надруковано російську літеру «Э» замість «Е». Формула речовини перекису водню - H_2O_2 – не є скороченням або аббревіатурою. У списку відсутнє пояснення аббревіатур «МДА», «АОА» зі стор. 58 та «АА», «NADH» зі стор. 97;
 - стор. 55. Вираз «Методологічна база та обладнання» не є коректним, бо «методологія» за визначенням є «сукупність прийомів дослідження» або «вчення про методи пізнання»;
 - стор. 70. Вираз «... у ФДТ (фотодинамічному) стан, у якому знаходиться барвник (мономерна чи димерна)» не є коректним; мається на увазі агрегаційний стан;
 - стор. 100. «Супресуючий ефект» є англіцизмом; українською краще «ефект пригнічення»;
 - стор. 77. Не «розмірність НЧ», а «розмір»;
 - у хімічних формулах на Рис. 4.5, 4.8, 5.4, 5.5 індекси повинні бути у нижньому регістрі.
 - стор. 88. «через 24 год. спостерігається», «на 3 год експерименту» - у такому контексті «години» не скорочуються;
 - стор. 112. «в клітинах 3 місячних щурів, але не в клітинах 20 місячних» - треба писати «3-х» та «20-ти».
9. Є також зауваження до автореферату:
- у авторефераті у анотаціях на стор. 19-20 наведене ключове слово «механізми, mechanisms, механизмы» є багатозначним, треба було конкретизувати, які саме механізми (механізми яких процесів) маються на увазі.

Але наведені зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи у цілому.

Результати роботи, розроблені моделі та методики мають **практичне значення** для цілеспрямованої розробки редоксактивних НЧ біомедичного призначення та для удосконалення методів тестування їх активності на модельних системах. Отримані нові знання прояснюють вплив редоксактивних НЧ на генерацію активних форм кисню в абіотичних та біотичних системах в залежності від фізико-хімічних властивостей та розмірів НЧ.

Результати роботи можуть бути **впроваджені** як у наукових лабораторіях, які займаються фундаментальними біофізичними, молекулярно-фізичними та нанотехнологічними дослідженнями, так і у вищих навчальних закладах, зокрема у Фізико-технічному інституті низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, Інституті фізики НАН України, Харківському національному університеті ім. В.Н. Каразіна, Львівському національному університеті ім. Івана Франка, Сумському державному університеті, Національному технічному університеті "Харківський політехнічний інститут", Національному технічному університеті України "Київський політехнічний інститут", Інституті фізики НАН України та в інших установах та

лабораторіях, зацікавлених в розробці наноматеріалів для біомедичних та фармакологічних застосувань.

Наведений вище аналіз дозволяє заключити, що дисертаційна робота Аверченко К.А. є **завершеною науковою працею**, в якій отримано нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності **вирішують наукову біофізичну проблему** визначення механізмів впливу редоксактивних наночастинок на основі рідкоземельних елементів на основні показники мітохондріальної активності.

За обсягом проведених досліджень, високим науковим рівнем, новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертаційна робота Аверченко Катерина Андріївна «Механізми впливу редоксактивних наночастинок ($\text{ReVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ і $\text{CO}_2\text{-x}$) на біоенергетичні процеси в мітохондріях» відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567, а її авторка Аверченко Катерина Андріївна, безумовно, заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент
провідний науковий співробітник
відділу молекулярної біофізики
Фізико-технічного інституту низьких
температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,
с. н. с., доктор фіз.-мат. наук

Косевич М.В.

14 листопада 2016 р.

Особистий підпис Косевич М.В.

ЗАСВІДЧУЮ

Учений секретар Фізико-технічного інституту
низьких температур ім. Б.І. Веркіна
Національної академії наук України,
кандидат фізико-математичних наук



Калиненко О.М.

Вулиця Героїв 14. Н. 2016 р.

Учений секретар Іванів / Верес 12.11.