

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію

БЕРЕСТА Володимира Петровича

«Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів»

подану на здобуття наукового ступеня доктора

фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізики

Розв'язання проблеми встановлення зв'язку між структурою та функціями біологічно важливих молекул набуває особливого значення при вивченні функціонування молекул на межі поділу фаз. У цьому випадку, для біополімерів з невеликою кількістю ланок визначальну роль відіграють слабкі внутрішньо- та міжмолекулярні взаємодії, гідратація, стеричні обмеження. Так, мембранотропні пептиди проявляють біологічну активність при взаємодії з мембранами клітин адсорбуючись із полярного провідного розчинника на гетерогенну, заряджену ліпідно-білкову поверхню біомембрани. При цьому кінетичні та динамічні особливості сорбції та перерозподілу пептидів у мембрани визначають біологічний вплив пептиду та фізіологічний відгук клітини. Мембранотропна активність певного класу пептидів, наприклад, аніонних каналів, є необхідною для нормального функціонування клітин: підтримання об'єму, регуляції кислотності внутрішньоклітинного середовища тощо.

Відтак, з'ясування молекулярних механізмів взаємодії пептидів з мембранами відкриває шлях до можливості керування роботою цих сполук з метою корекції фізіологічних станів організму та впливу на перебіг хвороб. Зокрема, особливості самоасоціації та утворення  $\beta$ -складчастих агрегатів пріонними пептидами пов'язані з розвитком важких невиліковних нейродегенеративних захворювань людини та худоби. Антимікробні пептиди є важовою складовою вродженого неспецифічного імунітету, виявляючи особливості взаємодії з мембранами мікроорганізмів та клітин тіла людини, зараз розглядаються як важомий інструмент подолання зростаючої резистентності мікроорганізмів до дії традиційних антибіотиків.

З огляду на викладене, **актуальність** дисертаційного дослідження Береста В.П., в якому виявлено фізичні та біофізичні особливості взаємодії різних класів пептидів з модельними та природними мембранами, а також сформовано основи технології керування мембранотропною активністю цих біополімерів, не викликає сумніву. Задачі, вирішені в роботі Береста В.П., мають прикладне значення, а ряд одержаних результатів є патентоспроможними. Актуальність обраної теми дослідження підтверджує також її зв'язок з науковою діяльністю кафедри молекулярної і медичної

біофізики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, де дисертацію було виконано в рамках тем: «Механізми впливу фізичних факторів і біологічно активних речовин на ДНК, білки та біомембрани» (№ держреєстрації 0197U016741), «Дослідження ролі нанорозмірних газових включень у фізичних механізмах біологічної дії електромагнітних хвиль низької інтенсивності» (№ держреєстрації 0110U001435), «Біофізичні моделі молекулярної взаємодії граміцидину S» (№ держреєстрації 0118U002041 та програми НАТО «Science for Peace and Security Programme»).

За своєю структурою, дисертаційна робота Береста В.П. складається зі вступу, шести розділів, висновків, списку використаних джерел та додатку.

У **вступі** обґрунтовано актуальність обраної теми, сформульовано мету та задачі дослідження, визначено наукову новизну, практичну й теоретичну цінність отриманих результатів, визначено внесок здобувача у наукові праці, опубліковані у співавторстві та наведено загальну характеристику роботи.

**Перший розділ** «Механізми взаємодії мемброактивних пептидів з клітинами та модельними ліпідними системами» є оглядом літератури, який присвячено аналізу механізмів взаємодії різних класів пептидів з модельними та природними клітинними мембранами шляхом сорбції, агрегації у розчиннику чи на поверхні поділу, вбудовуванням в мембрани з утворенням чи без утворення пор. Ідентифіковано наявні на даний час суперечливі гіпотези та відсутність консенсусу у розумінні загального механізму пептид-мембраних взаємодій. Охарактеризовано структуру антимікробного пептиду граміцидину S (GS) та його аналогів, проаналізовано пропонований механізм протимікробної дії пептиду та похідних молекул. Також у розділі розглянуто структуру та динаміку біологічних мембран, визначено роль холестерину в біологічних мембрахах, розглянуто структурні зміни ліпідного бішару та плазматичних мембран клітин при дії температури. Проаналізовано молекулярні механізми активації та агрегації тромбоцитів. На підставі аналізу літературних джерел передбачається, що при зміні стану ліпідного бішару буде змінюватися і взаємодія молекул пептидів з ним.

У **другому розділі** «Методи дослідження й методика приготування зразків» детально описано використану методику визначення біофізичних характеристик поодиноких іонних каналів з застосуванням техніки бішарових ліпідних мембран (БЛМ) для вивчення провідності мембраних каналів, утворених пріонними пептидами, та електрофізіологічної характеристизації мембраних іонних каналів сімейства CLC. Описано методику виділення природних хлоридних каналів з мембран апарату Гольджі грибів *Saccharomyces cerevisiae*, визначення їх молекулярної маси. Подано способи отримання пласких та сферичних модельних ліпідних мембран різного

складу для вивчення взаємодії з ними антимікробного пептиду GS. Наведено характеристику методу надвисокочастотної (НВЧ) діелектрометрії, використаного для визначення гідратації мембрани при взаємодії з пептидами. Охарактеризовано оптичні методи дослідження агрегації тромбоцитів та гемолітичної стійкості еритроцитів, як індикаторів функціональних змін клітин крові під впливом пептиду GS, а також проточної цитометрії та імпедансної спектроскопії для визначення морфологічних та електрофізичних характеристик еритроцитів під впливом водних розчинів GS і ліпосом, навантажених пептидом. Особливу цінність має використаний здобувачем методичний підхід до вивчення мембранотропної дії пептидів – від встановлення особливостей взаємодії у модельних кількакомпонентних ліпідних системах до перевірки пропонованих механізмів та гіпотез у природних мембрanaх. Варто відзначити і проведення експериментів за фізіологічних умов, здебільшого без використання зовнішніх міток та зондів, здатних викривити процеси пептид–мембраних взаємодій, зокрема використання диполів води як природного маркера змін гідратації ліпідів мембрани при сорбції антимікробного пептиду GS. Здобувачем зроблено цілком обґрунтований висновок щодо адекватності та інформативності використаного в роботі комплексу методів мікрохвильової діелектрометрії, флуоресцентної спектроскопії, реєстрації струмів поодиноких іонних каналів, гель-електрофорезу, світlorозсіювання, мікрофлюїдіки та імпедансної спектроскопії для визначення механізму взаємодії пептидів з модельними та природними мембрanaами.

У третьому розділі «Дослідження біофізичних властивостей та наслідків модифікації мембарноактивних пептидів, здатних утворювати іонні канали в природних та модельних мембрanaх» наведено та проаналізовано результати вивчення можливості реалізації високого агрегаційного потенціалу пептидів – похідних людського пріону – в утворення олігомерних іонних каналів при перерозподілі у бішарові ліпідні мембрани та модифікацію іонного балансу клітини. Експерименти із БЛМ проведено на рівні поодиноких молекул, визначено провідність та селективність іонних каналів, сформованих внаслідок агрегації пріонних пептидів. Для визначення можливих патологічних наслідків каналоутворення пріонними пептидами, вивчено їх вплив на мембраний потенціал та швидкість дихання мітохондрій мозку. Передбачена раніше в літературі за допомогою алгоритмів штучного інтелекту схильність вивчених неупорядкованих у водній фазі PrP пептидів до формування бета-структур була підтверджена експериментально, причому було продемонстровано, що катіон-селективний канал, утворений ділянкою PrP N171S, може впливати на іонну рівновагу

клітини. Вартим уваги є факт утворення іонних каналів пептидом зі зміненою первинною структурою – заміною неполярного аспарагіну на серин, яка відповідає природній мутації, асоційованій із психічними захворюваннями. Таким чином, ідентифікована пептидна послідовність може стати терапевтичною мішенню для створення ліків від нейродегенеративних патологій. Цей результат підкреслює важливе практичне значення результатів дослідження.

Інший спосіб взаємодії пептидів з мембранами вивчено на прикладі реконституції рекомбінантного поліпептиду gefl з мікосомальної фракції апарату Гольджі дріжджів у модельні ліпідні мембрани. На рівні поодиноких молекул з'ясовано, що gefl є аніон-селективним, потенціал-залежним іонним каналом. Модифікація цього пептиду ковалентним об'єднанням з С-кінця з зеленим флуоресцентним білком – GFP, або колокалізація в мембрани з іншим інтегральним білком мембран апарату Гольджі не впливає на функцію gefl в клітині, отриманий химерний поліпептид має таку ж ефективність, як і вихідний gefl.

**Четвертий розділ** «Структурно-динамічний стан ліпідів мембран визначає характер взаємодії циклічного олігопептиду GS з тромбоцитами» присвячено вивченю взаємодії природного антимікробного пептиду граміцидину S з мембранами тромбоцитів та впливу зміни гідратації, ступеня окислення та фазового стану ліпідів мембран тромбоцитів на зв'язування з поверхнею клітин. Уперше встановлено  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну зміну форми тромбоцитів та активацію клітин мікромолярними концентраціями GS. Спровоковане зовнішніми фізичними та хімічними чинниками зменшення міров'язкості та збільшення гідратації бішару полегшує вбудування пептиду в мембрани клітин крові. Збільшення кривизни мембран тромбоцитів сприяє зменшенню спорідненості до нього молекул GS. Особливий практичний інтерес становить знайдений автором антиагрегаційний ефект граміцидину, а надто – руйнування утворених тромбоцитарних агрегатів антимікробним пептидом. Для вперше встановленої дезагрегації тромбоцитів під дією GS, механізм процесу пояснено розривом білкових фібринових містків, які з'єднують клітини в агрегаті, при вбудування пептиду в мембрани. Розроблено математичну модель кінетики агрегації тромбоцитів та використано її для аналізу дезагрегації клітин. На основі оптимізації констант швидкостей інактивації та дезагрегації клітин, визначено два основних механізми руйнування агрегатів тромбоцитів у зсувних потоках. Можливість практичного використання ідентифікованого впливу пептиду на роботу системи згортання крові передбачає створення місцевих тромболітичних засобів та розробки фармпрепаратів для системного

використання GS при лікуванні внутрішньосудинного тромбоутворення, наприклад, набутого внаслідок Covid-19. Результати розділу свідчать що варіація структурно-динамічних властивостей природних клітинних мембран впливає на параметри зв'язування антимікробного пептиду GS з мембранами тромбоцитів та викликаний пептидом біологічний ефект.

У п'ятому розділі «Модифікація гемолітичної активності граміцидину S» описано міжмолекулярні взаємодії та зміни складу мембрани еритроцитів, які впливають на сорбцію циклічного поліпептиду GS, зміну форми та лізис клітин. Експериментально визначені лаг-періоди та швидкості гемолізу й розраховані енергії активації лізису клітин під дією GS, дозволили встановити, що обмеження рухливості жирнокислотних залишків ліпідів у гідрофобній області мембрани полегшує вбудовування GS у мембрани еритроцитів, попередньо інкубованих із про- та антиоксидантами. Зменшення щільності упакування ліпідів у бішарі при перекисному окисленні й гамма-опроміненні *in vitro* полегшує вбудовування, але знижує міцність зв'язування GS з мембранами еритроцитів. Практично значущими є результати, встановлені при вивченні лізису природно збагачених холестерином мембран еритроцитів хворих із серцево-судинними патологіями. У цьому випадку підвищений вміст холестерину й активація перекисного окислення ліпідів у мембрани еритроцитів майже повністю пригнічують гемолітичну активність GS. З'ясовано, що рухливість і гідратація ліпідів мембрани визначають характер гемолітичної активності циклічного антимікробного пептиду. Ідентифіковано вплив поверхневого потенціалу та структури глілокаліксу на сорбцію граміцидину S на мембрани еритроциту. Концентраційні залежності дзета-потенціалу від концентрації адсорбованого пептиду GS пояснено мультишаровою сорбцією молекул пептиду на мембрани з розгалуженою мережею полісахаридів глілокаліксу. Для послаблення літичного ефекту катіонного GS проведено вивчення взаємодії GS, інкапсульованого у сферичні 100 нм ліпосоми з ДПФХ, з еритроцитами. Надійно доведено, що модуляція електростатичних та гідрофобних взаємодій пептид-мембрана уповільнює кінетику перерозподілу GS в мембрани клітин крові з ліпідних везикул та засвідчує високий терапевтичний потенціал використання ліпосомальних наноносіїв для спрямованої доставки антимікробних пептидів.

Шостий розділ «Способи керування взаємодією антимікробного пептиду GS з ліпідними мембранами» подає результати проведеного методами мікрохвильової діелектрометрії, флуоресцентної спектроскопії, диференційної сканувальної калориметрії експериментального вивчення способів модуляції мембраних ефектів циклічного декапептиду граміцидину S шляхом зміни ліпідного складу модельних мембран та

інтенсивності міжмолекулярних взаємодій. Зокрема, зафіковано дегідратацію фосфатних груп фосфоліпідів при зв'язуванні з GS. Допування модельних ДПФХ та ДПФХ-кардіоліпінових (ДПФХ+КЛ) мембран холестерином (ХЛ) зумовлює розупорядкування структури об'єму води в ліпосомах з вмістом 30% ХЛ, проте вміст 10% ХЛ викликає протилежні зміни. Продемонстровано, що зміну діелектричних параметрів розчинника в комплексах граміцидину GS з ліпосомами можна використовувати для контролю накопичення та вивільнення GS з ліпідних везикул і оцінки стійкості комплексів фармпрепарату з наноносієм. За допомогою флуоресцентних зондів виявлено зміни фізичного стану неполярної області ліпідного бішару модельних мембран при сорбції GS в області інтерфейсу. На грунті аналізу всього масиву експериментальних даних запропоновано модель взаємодії циклопептидного GS з ліпідними мембрани у мономерній та олігомерній формах. Перемикання між двома типами зв'язування GS із ліпідними мембрани контролюється дезагрегацією димерів GS на поверхні ліпідної мембрани, зарядом поверхні та щільністю пакування ліпідів. Зокрема виявлено, що зіркоподібний полімер D-g-PAA(PE) зменшує загальний мембранотропний ефект GS щодо мембран з ДПФХ, сприяючи зв'язуванню з мембраною олігомерів GS.

Характеризуючи роботу в цілому, необхідно відзначити, що матеріали досліджень викладено детально й послідовно, ясною мовою, дисертація добре проілюстрована та не містить ознак плагіату. Кожний розділ закінчується висновками, що акцентують увагу на найбільш суттєвих результатах. Основні результати є новими та вперше отримані автором дисертації. Безсумнівну наукову новизну роботи підтверджує також опублікування основних результатів роботи в 21 статті у вітчизняних та міжнародних фахових наукових журналах, які проіндексовано у наукометричних базах Scopus та/або Web of Science та в 20 матеріалах з їздів, конгресів, конференцій на яких для апробації було представлено доповіді за матеріалами дисертації. У відповідності з підпунктом 1 пункту 2 Наказу Міністерства освіти і науки України від 29 вересня 2019 року № 1220 Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук загальна кількість наукових публікацій, які розкривають основний зміст дисертації Береста В.П., становить 24, адже наукова публікація у виданні, віднесеному до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, прирівнюється до трьох публікацій, у виданні, віднесеному до третього квартиля (Q3), – до двох публікацій. Усі наукові положення, висновки та гіпотези,

сформульовані у дисертації, є добре обґрунтованими та достовірними. Автореферат повністю відображає основні положення дисертації.

Разом з тим, при загальній позитивній оцінці, робота не позбавлена деяких недоліків. Зокрема:

1. Не акцентовано увагу на тому, чи можливо було б додатково деталізувати встановлені у роботі молекулярні механізми модуляції взаємодії мембранотропних пептидів з модельними та природними ліпідними мембраниами в разі доповнення одержаних результатів експериментальних досліджень даними комп'ютерного моделювання, наприклад – методом молекулярної динаміки. При цьому, поряд із потенційним отриманням на основі такого моделювання додаткових мікроскопічних уявлень можна було більш детально розглянути і зворотну можливість: виокремити ті експериментальні результати, які могли б бути корисними для калібруванні або перевірки коректності наявних математичних моделей (наприклад, для уточнення потенціалів міжчастинкової взаємодії у силових полях на основі моделі об'єднаних атомів (англ. coarse-grained force fields)).

2. Оскільки чимало зразків, досліджених у роботі, містили "крихкі" біологічні об'єктів, структура та/або стабільність яких може істотним чином залежати від зовнішніх умов і методики приготування зразків та проведення експериментів, хотілося б більш докладно зупинитися на тому, яким чином гарантували, що приготовані/синтезовані зразки містять саме ті речовини і саме з тією структурою (наприклад, фрагментація/полімеризація/протонування/депротонування/абсорбція сторонніх речовин тощо), яка розглядалася при інтерпретації експериментальних даних.

3. Які фактори в умовах проведених експериментів визначали можливість впливу холестерину може на механізми взаємодії GS із мембраною? Чи зводяться такі фактори суто до якісних уявлень про зміну щільності упаковки гідрофобних частин ("хвостів") молекул мембрани?

4. Наскільки загальним є зафіковані у роботі механізми  $K^+/Cl^-$ -селективності у каналів, які в мембрани формують досліджені пептиди? Чи є типовим те, що ці канали пропускають саме певні йони (і не пропускають інші), чи селективність як така не перевірилася?

5. На мою думку, могло б бути доречним виокремити та згрупувати перелік тих речовин (включаючи фармпрепарати), які розглядалися як домішки у роботі, аби більш цілісно обґрунтувати їх вибір з огляду на завдання роботи. Чи можна стверджувати, що одержані результати підтвердили правильність зробленого вибору та дозволили виявити нові прояви біологічної активності розглянутих поліпептидів?

Проте, ці зауваження жодним чином не применшують загальну позитивну оцінку роботи. Дисертація Береста Володимира Петровича «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» є завершеною науковою працею, в якій зроблений вагомий внесок у вирішення важливих проблем молекулярної біофізики та біофізики мембран, пов'язаних з визначенням залежності мембранотропних ефектів пептидів від структури молекул, та особливостей міжмолекулярних взаємодій в ліпідній матриці для розробки технології керування біологічною активністю природних пептидів.

За обсягом проведених досліджень, якістю, актуальністю, новизною, достовірністю отриманих результатів та повнотою їх викладення, дисертація «Біофізичні властивості природних мембранотропних пептидів» повністю відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., а її автор – Берест Володимир Петрович – заслуговує на присудження йому наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

**Офіційний опонент:**

асистент кафедри молекулярної фізики  
фізичного факультету  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка,  
доктор фіз.-мат. наук

Тимофій НІКОЛАЄНКО

