



**ДОВБЕШКО**

**Галина Іванівна –**

доктор фізико-математичних наук, виконувач обов'язків завідувача відділу фізики біологічних систем Інституту фізики НАН України

## **СПЕКТРОСКОПІЧНІ МАРКЕРИ БІОЛОГІЧНИХ МОЛЕКУЛ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В БІОТЕХНОЛОГІЯХ ТА МЕДИЦИНІ: СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ**

**Стенограма доповіді на засіданні  
Президії НАН України 31 травня 2023 року**

*У доповіді наведено результати проведених в Інституті фізики НАН України експериментальних і теоретичних досліджень з вивчення за допомогою методів спектрального аналізу та методів чисельного моделювання фізичних механізмів функціонування різних біологічних макромолекул (білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди), надмолекулярних нанорозмірних біологічних систем (біологічні мембрани) та наноструктур (наноструктуровані поверхні та наночастинки), що містять біологічні молекули.*

Шановний Анатолію Глібовичу!

Шановні колеги!

Застосування фізико-математичних методів для дослідження різних сфер життєдіяльності людини є важливим елементом сьогодення і визначає прогрес у багатьох галузях науки. В умовах війни, коли практично всі проблеми загострюються, значущим є внесок фундаментальної науки у пошук ефективних рішень великої кількості першорядних і нагальних питань.

Мою доповідь присвячено спектроскопічним маркерам для біологічних молекул та клітин, які є визначальними для отримання інформації про структуру та склад молекули або кристала, даних про клітину та її стан. Йдеться насамперед про молекулярні групи, конформації біомолекул, окремі комплекси, взаємодію з лігандами, домішки тощо. Для досліджень ми використовуємо сучасні експериментальні методики коливальної спектроскопії, а саме, методи інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії, раманівської спектроскопії (РС) та когерентної антистоксової раманівської спектроскопії (КАРС).

Перш ніж перейти до розгляду отриманих нами результатів, хочу згадати імена двох дослідників, які зробили осново-

положний внесок у розвиток цієї тематики в Інституті фізики НАН України. По-перше, це видатний фізик-теоретик доктор фізико-математичних наук, професор Валерій Миколайович Харкянен, який 27 років тому організував і очолив відділ фізики біологічних систем, а по-друге, відомий фізик-спектроскопіст доктор фізико-математичних наук, професор Галина Олександрівна Пучковська, праці якої значною мірою вплинули на розвиток спектроскопічної тематики.

Отже, в коливальній спектроскопії спектроскопічні маркери — це інтенсивність, півширина, частота, поляризація смуг, а також їх комбінації, які є чутливими до зміни структури молекул або кристалів під впливом зовнішніх чинників. Встановлення спектральних маркерів є важливим напрямом у сучасній біофізиці, оскільки завдяки високій специфічності коливальних спектрів та їхній конформаційній чутливості можна без додаткового використання міток на молекулярному рівні виявити відмінності у структурі ДНК, білків, ліпідів, визначити конформаційні стани біомолекул, структурні перебудови, які відбуваються у клітинній мембрані, зміни молекулярного складу тканин, а також відрізнити нормальний стан від патологічного, причому з точністю, не доступною іншим методам.

Сучасний рівень розвитку біонанотехнологій потребує відповідей на питання: як взаємодіють білки, ДНК, ліпіди з іншими молекулами, наноструктурами, клітинами, вірусами; які зміни відбуваються під впливом зовнішніх електромагнітних полів тощо. Використання методів коливальної спектроскопії для розв'язання цих проблем є ефективним і перспективним. Однак це зовсім не просте завдання, і його вирішення потребує достатніх напрацювань, вмінь та досвіду в розшифруванні спектрів складних біологічних молекул, зокрема у визначенні маркерів конформаційних станів та різних структур.

Наприклад, смуги Амід I та Амід II білка можуть визначати внесок різних конформацій у структуру, але внески для різних білків однієї конформації можуть різнитися спек-

троскопічно. Те саме стосується маркерів взаємодій складних біомолекул з різними чинниками. Тому зазвичай необхідна кореляція з іншими фізичними методами — ЯМР, ЕПР, фотоелектронною спектроскопією, рентгеноструктурним аналізом, мас-спектроскопією, елементним аналізом, оптичною чи електронною мікроскопією або з результатами модельних розрахунків. Крім того, для цих досліджень необхідною умовою є наявність баз даних, чутливого спектрального обладнання, а також підготовлених фахівців, які володіють певними спеціальними підходами. На жаль, на сьогодні база приладів для використання зазначених вище методів у нас недостатня, обладнання здебільшого застаріле, деяких найважливіших сучасних приладів взагалі немає, бракує також фахівців, які мають достатній досвід роботи.

Відділ фізики біологічних систем Інституту фізики НАН України працює на сучасному спектральному обладнанні — інфрачервоних фур'є-спектрометрах, які більш чутливі і мають кращі спектральні характеристики, ніж ґраткові чи призмові прилади. За останні два роки наша база поповнилася приладами нового (за принципом роботи) покоління — фур'є-спектрометром INVENIO-R з приставкою для біологічних зразків; флуоресцентним спектрометром FS-55 Edinburgh Instruments з новим принципом детектування сигналу; портативним раманівським мініприладом Lightnovo, який виявився незамінним для низки спеціальних завдань, зокрема щодо визначення стану шкіри *in vivo*.

Іншим прикладом використання спектроскопічних маркерів є співвідношення інтенсивності між модами D, G, 2D у графітових матеріалах. Їх положення та півширина визначають тип вуглецевих матеріалів та наночастинок.

Отже, спектроскопічні маркери вказують на структурні особливості молекули чи кристала, що зумовлює їх застосування в аналітичних дослідженнях.

Що ж можна визначити за допомогою спектроскопічних маркерів? Тип молекул, вірусів

або органел за їхнім молекулярним складом, конформацію складних молекул або біополімерів, стан клітини (апоптоз, некроз), етап клітинного циклу, взаємодію з наночастинками та лікарськими засобами. Можна також характеризувати фізичний процес, у якому досліджувана молекула бере участь (окиснення, відновлення, перенос заряду, тип взаємодії з оточенням або іншими молекулами тощо).

У сучасних біонанотехнологіях знання про спектроскопічні маркери необхідні насамперед для створення біодетекторів, у медицині — для розроблення нових методик діагностики, лікування, способів доставки ліків.

Крім того, бази даних спектроскопічних маркерів використовують і в інших галузях, таких як:

- біохімія — для визначення сайтів взаємодії біологічних молекул;
- фармацевтика — для визначення чистоти препаратів;
- мистецтвознавство — для аналізу справжності картин або ювелірних виробів;
- молекулярна археологія — для отримання знань про історичні події;
- легка, харчова та аграрна промисловості — для відпрацювання технологій та визначення якості продуктів;
- матеріалознавство — для визначення молекулярного складу речовин, порошоків, сплавів тощо.

Загалом розвиток суспільства постійно потребує нових матеріалів, знань про їхню структуру, створення алгоритмів пошуку та обробки відповідної інформації.

У відділі фізики біологічних систем Інституту фізики НАН України дослідження виконують за такими напрямками:

- вивчення впливу 2D-наночастинок (2D-VN, 2D-дисульфідів перехідних металів, фосфоренів) на культури нормальних і аномальних клітин;
- дослідження структурних переходів у ліпідах і нуклеїнових кислотах пухлинних тканин при взаємодії їх з протипухлинними препаратами;

- вивчення конформаційного складу фосфоліпідів з пухлинної тканини чутливих і резистентних штамів;

- визначення спектральних характеристик різних типів вуглецевих наноструктур (фулеренів, квантових точок, одностінних та багатостінних нанотрубок, графенів) та дослідження їх взаємодії з біологічними молекулами і клітинами;

- визначення спектральних маркерів вторинної структури амілоїдних агрегатів на модельних і реальних об'єктах;

- вивчення структури колагенів у складі нормальних і патологічних тканин;

- дослідження дії противірусних і тромболітичних препаратів (ремдесивір, тикагрелор) на реальних і модельних мембранних клітинах;

- визначення біофізичних маркерів циркулюючих метастатичних клітин;

- створення SERS-підкладок на основі фотонних кристалів.

Отримані нами результати було успішно застосовано на практиці. Наведу лише кілька прикладів.

Так, спільно з Державною установою «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України» ми дослідили морфологічні особливості зрізів патологічних тканин, зокрема провели аналіз вторинної структури колагену тканин твердої мозкової оболонки (ТМО) [1, 2]. Вивчено конформаційний склад колагену з регенеруючих тканин ТМО після змодельованої черепно-мозкової травми, здійснено оцінку ефективності використаних методів терапії *in vivo*.

Для проведення хірургічної пластики твердої мозкової оболонки на моделях ми використовували різні біополімерні плівки (на основі колагену, желатину, хітозану; зарубіжні комерційні зразки та плівки, зроблені в Україні). В результаті найкращими було визнано біополімерні плівки, вироблені в Інституті хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України.

Спільно з Інститутом біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було отримано кореляцію наших даних з даними конфокальної мікроскопії. Методика ІЧ-спектроскопії дозволила

контролювати динаміку процесу регенерації тканин твердої мозкової оболонки на різних етапах загоєння хірургічної травми. За даними аналізу ІЧ-спектрів поглинання визначено спектральні маркери рубцевої тканини, регенеруючої ТМО та контрольної інтактною твердої мозкової оболонки і показано, що рубцева тканина кардинально відрізняється від тканин регенеруючої ТМО в усіх групах, у тому числі й у групі аутопластики.

Це дозволяє достовірно відрізнити рубцеву тканину від інших досліджуваних тканин та полімерних плівок на основі колагену, желатину, хітозану. Додаткове застосування желатину прискорює процес деградації плівки хітозану і сприяє нормальному загоєнню травми. Використання колагенових плівок дає позитивний ефект на ранніх стадіях загоєння, однак у подальшому спостерігається тенденція до утворення рубцевої тканини. Використання желатинової плівки паралельно з колагеновою сприяє повному відновленню твердої мозкової оболонки без ознак утворення рубця.

Другий приклад практичного використання отриманих нами результатів стосується спільного з Інститутом експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України дослідження взаємодії різних патологічних клітин, зокрема пухлин та їхніх резистентних штамів, з наночастинками 2D-BN, 2D-MoS<sub>2</sub>, 2D-WS<sub>2</sub> в комплексі з доксорубіцином. Ці наночастинки було вироблено й модифіковано в Інституті фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського НАН України. У співпраці з Інститутом молекулярної біології та генетики НАН України ми визначили маркери взаємодії наночастинок 2D-BN з мембраною та входження їх у клітину, показали протекторну дію цих наночастинок [3, 4].

Запропоновані нами підходи було також апробовано і застосовано на практиці при розробленні фундаментальних засад механізму дії тромболітичного препарату тикагрелор та противірусного препарату ремдесивір.

Ремдесивір — це новий нуклеозидний аналог із широким спектром дії проти РНК-вірусів. Він був розроблений проти вірусу Ебо-

ла (EBOV), але має досить високу активність і проти коронавірусів (MERS-CoV, SARS-CoV і SARS-CoV-2). Під час пандемії коронавірусної хвороби COVID-19 було показано, що ремдесивір скорочує термін одужання пацієнтів з тяжкою формою захворювання, що й зумовило надання екстреного дозволу на використання цього препарату.

Ми визначили маркери ремдесивіру і з'ясували, що він активується в клітині завдяки утворенню нуклеозидтрифосфату і конкурує з ендогенними природними нуклеозидами за включення в реплікацію вірусної РНК, що спричиняє обрив РНК-ланцюга. Важливо, що активність РНК-полімерази людини не пригнічується за присутності ремдесивіру.

Взаємодію препарату ми вивчали на моделі з синапсоматоми (кінчики нейронів) спільно з науковою групою професора Т.І. Борисової (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України). Було зроблено раман-картування синапсомом після дії ремдесивіру і проведено симуляцію методом молекулярної динаміки. Показано, що цей противірусний препарат проявляє мембранотропну активність, взаємодіючи по фосфатних групах та СН-зв'язках ліпідів, спонтанно вбудовується у клітинну мембрану нейронів, що й впливає на виділення нейромедіаторів. Ці властивості ремдесивіру досі були невідомі [5, 6].

На модельних мембранах у вигляді ліпосом ми показали, що ремдесивір порушує структуру ліпідних рафтів у мембрані, які накопичують рецептори для білка С коронавірусу, запобігаючи тим самим проникненню вірусу в здорові клітини. Тому ми запропонували фахівцям-фармакологам розглянути можливість розроблення противірусних препаратів зі структурою, подібною до аденозинових аналогів типу ремдесивіру, що проявляє мембранотропні властивості.

Розповідаючи про ці роботи, хочу згадати нашого колегу, наукового співробітника відділу фізики біологічних систем Інституту фізики НАН України Володимира Федорова, який з початком війни став до лав Збройних сил України як військовий медик 71-ї окремої

егерської бригади десантно-штурмових військ (позивний Скальпель). 15 березня 2023 р. він загинув у бою під Авдіївкою. Володимир Федоров був досвідченим ІТ-спеціалістом, займався обробкою спектрів, розробляв методи підвищення контрастності зображень, розпіз-

навання образів. Йому було 35 років. Вічна пам'ять герою!

Дякую за увагу!

За матеріалами засідання  
підготувала О.О. Мележик

## REFERENCES

1. Panteleichuk A.B., Kadzhaya N.V., Shmeleva A.A., Malysheva T.A., Gnatyuk O.P., Dovbeshko G.I. Theoretical substantiation of the efficiency of biopolymers application in experimental TBI (literature review and own results). *Ukrainian Neurosurgical Journal*. 2019. **25**(4): 64–71. <https://doi.org/10.25305/unj.184031>
2. Panteleichuk A., Kadzhaya M., Biloschytsky V., Shmeleva A., Petriv T., Gnatyuk O., Dovbeshko G., Kozakevych R., Tyortyh V. Composite chitosan/polyethylene oxide film for duraplasty in traumatic brain injury model in rats. *Cell and Organ Transplantation*. 2020. **8**(1): 26–31. <https://doi.org/10.22494/cot.v8i1.105>
3. Kolesnik L., Pyaskovskaya O.N., Gnatyuk O.P., Cherepanov V.V., Karakhim S.O., Polovii I.O., Posudievsky O.Yu., Konoshchuk N.V., Strelchuk V.V., Nikolenko A.S., Dovbeshko G.I., Solyanik G.I. The effect of 2D tungsten disulfide nanoparticles on Lewis lung carcinoma cells in vitro. *RSC Advances*. 2021. **11**(27): 16142–16150. <https://doi.org/10.1039/D1RA01469B>
4. Gnatyuk O.P., Dovbeshko G.I., Yerшов A., Karakhim S.O., Ilchenko O., Posudievsky O.Yu. 2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker and drug delivery system with protection properties. *RSC Advances*. 2018. **8**(53): 30404–30411. <https://doi.org/10.1039/C8RA05085F>
5. Krisanova N., Pozdnyakova N., Pastukhov A., Dudarenko M., Shatursky O., Gnatyuk O., Afonina U., Pyshev K., Dovbeshko G., Yesylevskyy S., Borisova T. Amphiphilic anti-SARS-CoV-2 drug remdesivir incorporates into the lipid bilayer and nerve terminal membranes influencing excitatory and inhibitory neurotransmission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2022. **1864**(8): 183945. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2022.183945>
6. Gnatyuk O.P., Afonina U.K., Krisanova N., Pozdnyakova N., Borisova T.O., Karakhim S.O., Dovbeshko G.I. Spectroscopic signatures of synaptosomes: ATR-IR spectroscopy study. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2022. **749**(1): 25–32. <https://doi.org/10.1080/15421406.2022.2067672>

Galina I. Dovbeshko

*Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7701-0106>

## SPECTROSCOPIC MARKERS OF BIOLOGICAL MOLECULES AND THEIR APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE: STATUS AND PROSPECTS

Transcript of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, May 31, 2023

The report presents the results of experimental and theoretical research carried out at the Institute of Physics of the NAS of Ukraine to investigate, using spectral analysis and numerical modeling methods, the physical mechanisms of the functioning of various biological macromolecules (proteins, nucleic acids, lipids), supramolecular nanoscale biological systems (biological membranes) and nanostructures (nanostructured surfaces and nanoparticles) containing biological molecules.

**Cite this article:** Dovbeshko G.I. Spectroscopic markers of biological molecules and their application in biotechnology and medicine: status and prospects. *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* 2023. (8): 69–73. <https://doi.org/10.15407/visn2023.08.069>