

12 ТРА 2016

Вх.№

50/03-07 НВР/3

1

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу І.Ю. Курільченко «Флуоресцентне мічення нанорозмірних контейнерів для візуалізації їх взаємодії з біологічними об'єктами», яка подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Актуальність теми. У сучасному світі кількість застосувань нанотехнологій, які використовуються або знаходяться в стадії розробки, росте в геометричній прогресії, і саме з ними пов'язані перспективні напрямки розвитку фундаментальних, і прикладних досліджень, які націлені на виробництво наукомістких інноваційних виробів, у тому числі біомедичного напрямку. Наноструктури дозволяють вирішувати адресну доставку ліків до конкретних органів, а також створювати надчутливі сенсори і діагностичні засоби. Ідея використання наноструктурованих контейнерів для спрямованої доставки ліків викликає підвищений інтерес у фахівців в галузі біомедицини не лише через успіхи у створенні нових наноматеріалів, але й у зв'язку з низькою ефективністю традиційних способів введення ліків. Крім того, медичні препарати, доволі часто, викликають побічні ефекти, тому їх дози суворо обмежені. Застосування «наноконтейнерних» форм лікарських засобів надає змогу уникнути вказаних недоліків традиційних фармпрепаратів. Проте залишаються питання, які стосуються взаємодії «наноносія» з органічними молекулами (лікарськими засобами та іншим), взаємодії з тим або іншим типом клітин, механізму проникнення в клітину «наноносія» та вивільнення лікарського засобу в ураженому органі. При цьому великі перспективи пов'язують з флуоресцентними методами, оскільки вони по-перше є відносно простими для застосування, по друге передбачають застосування флуоресцентних міток і зондів, тобто спеціально синтезованих речовин, що мають специфічний спектр флуоресценції або у вільному стані, або при зв'язуванні з тим або іншим об'єктом дослідження. До того ж мічення «наноносія» за

допомогою флуоресцентних зондів дозволяє використовувати методи флуоресцентної мікроскопії й мікроспектроскопії для візуалізації «наноконтейнера» й моніторингу його взаємодії з живими клітинами в експериментах *in vitro*.

Дисертаційна робота І.Ю. Курільченко присвячена саме проблемі розробки методу флуоресцентного маркування нанорозмірних контейнерів для довгострокового моніторингу їх взаємодії з живими клітинами в динаміці та експериментальному тестуванні розробленого підходу на клітинах різних типів та клітинних органелах і тому, безумовно, є абсолютно актуальною в науковому та прикладному аспектах. Істотним показником актуальності дисертаційної роботи є також та обставина, що пов'язані з нею дослідження виконувалися відповідно до наукових програм Інституту сцинтиляційних матеріалів НТК «Інститут монокристалів» НАН України в рамках чотирьох держбюджетних тем.

Не викликає жодних сумнівів обґрунтованість наукових положень, висновків дисертації та їх достовірність. Планування досліджень, їх послідовність, методи, що використані, є цілком адекватними вирішенню поставлених завдань. Роботу характеризує грамотна постановка всіх експериментів, опрацювання їх результатів, а також кореляції ряду результатів із уже відомими літературними даними. Для вирішення поставлених у роботі завдань автором було використано сучасне обладнання для роботи з живими клітинами та клітинними органелами, спектроскопічне обладнання, обладнання для отримання флуоресцентних зображень клітин та проведення аналізу зміни сигналу флуоресценції зондів. Зроблені автором висновки логічно впливають із наведених результатів. Усе це свідчить про серйозну обґрунтованість наукових положень, висунутих дисертанткою, і дозволяють вважати, що робота, яку вона виконала, є доцільною.

Наукова новизна результатів роботи полягає в тому, що більшість описаних у дисертаційній роботі результатів отримано вперше. Найцікавішими, на мій погляд, є такі результати:

1. Встановлено, що у водних розчинах досліджені органічні барвники утворюють стійкі комплекси з ліпосомами переважно за рахунок гідрофобної взаємодії. Комплекси «ліпосома – барвник» характеризуються значними константами зв'язування та майже 100% зв'язуванням барвників у розчинах, що дозволяє використовувати їх для проведення FRET-мічення та кодування наноконтейнерів.

2. Вивчено особливості безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження між декількома флуорофорами в нанооб'ємі міцел і ліпосом.

3. Досліджено вплив фізико-хімічних властивостей і структури молекул барвників на ефективність FRET між ними в нанооб'ємі.

4. Уперше запропоновано методику оцінки накопичення флуоресцентних зондів у клітинах за зміною загальної яскравості флуоресцентних зображень, що отримані за різні часи інкубування клітин з міченими ліпосомами.

5. Оцінена ефективність розроблених FRET-композицій і методу λ-раціометрії для маркування ліпосомальних контейнерів при дослідженні їх взаємодії з клітинами різних типів у динаміці.

Структура, обсяг і зміст дисертації. Представлена дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, базується на достатній кількості експериментальних матеріалів. Дисертаційна робота побудована згідно з нормативними документами відповідно до вимог ДАК України.

Рукопис складає 141 сторінку, містить 53 рисунки, 3 таблиці. Список використаних джерел складається з 157 посилань.

У структурі дисертації є вступ, чотири глави (одна із яких є оглядовою, друга методичною, яка, як і інші глави містить оригінальні результати) і висновки. Глави детально структуровані, наприкінці кожної глави містяться висновки. Матеріали дисертації викладено ясно, послідовно й лаконічно у відповідності до існуючих стандартів. Наведені ілюстрації в повній мірі відображають зміст матеріалу, що наводиться.

У вступі й огляді літератури автором критично проаналізовано сучасний стан нанотехнологій та розглянуто питання щодо використання різних типів наноконтейнерів в біологічних дослідженнях та медицині. Особлива увага приділяється ліпосомальним везикулам та полімерним міцелам, наведено дані щодо механізмів націленої доставки за допомогою наноносіїв, проаналізовано сучасний стан використання флуоресцентних методів для візуалізації та дослідження біооб'єктів, представлено розширений критичний огляд робіт, присвячених флуоресцентному міченню ліпосомальних наноконтейнерів та наголошується на тих проблемах, які існували в цій галузі на початку роботи дисертанта. Даний огляд літератури можна було б опублікувати окремою роботою.

Для вирішення поставлених у роботі завдань автор роботи використовувала різні сучасні методики, зокрема спектрофотометрію, флуоресцентну спектроскопію та спектроскопію збудження флуоресценції, лазерну флуоресцентну спектроскопію з часовим розділенням, флуоресцентну мікроскопію та мікроспектроскопію, опису яких присвячена друга глава роботи.

Оцінюючи інші оригінальні глави, треба відзначити, що експерименти проведено систематично та вичерпно. Оскільки основним напрямком дисертаційної роботи є розробка методу флуоресцентного маркування нанорозмірних контейнерів для довгострокового моніторингу їх взаємодії з живими клітинами, відправною точкою таких досліджень є інформація про флуоресцентні властивості барвників, інкорпорованих у ліпідний бішар ліпосоми ФХ або в нанооб'єм міцели ДСН, що представлено в третій главі. Для цього проведено дослідження ефективності утворення комплексів «органічний барвник – наноконтейнер (міцела/ліпосома)», оцінено константи зв'язування органічних барвників DiO, DiI, DiD з ліпосомами ФХ з використанням модифікованого рівняння Скотта та розраховано термодинамічні параметри комплексоутворення (енергія Гібса ΔG^0 , ентальпія ΔH^0 , ентропія ΔS^0). Також, у главі здійснено підбір композицій

для флуоресцентного мічення органічних наноконтейнерів із метою дослідження їх взаємодії з біооб'єктами в динаміці. Для цього було здійснено підбір тандемних барвників для створення FRET-композицій, вивчено ефективність FRET у нанооб'ємі міцел ДСН та ліпосом ФХ і проведено порівняльний аналіз для пар барвників.

Четверта глава присвячена практичному використанню ідей, що були запропоновані в главі 3, а саме розробці й тестуванню методу λ -ратіометрії для детектування взаємодії FRET-мічених ліпосом із живими клітинами різних типів в експериментах *in vitro* за допомогою мікроспектроскопії. Показано, що FRET-мічені ліпосоми взаємодіють з усіма клітинами й клітинними органелами, вибраними в якості об'єктів дослідження. Продемонстровано, що FRET-маркування ліпосом надає змогу виявити відмінності в динаміці та ефективності взаємодії наноконтейнерів із клітинами з різним складом компонентів плазматичних мембран, та різною метаболічною та функціональною активністю цих клітин. Досліджено взаємодію FRET-ліпосом з чутливими та резистентними клітинами раку молочної залози людини.

У цілому дисертація виконана на високому науковому рівні й свідчить про високу фахову та кваліфікаційну підготовку здобувача. В той же час, в процесі ознайомлення з матеріалами дисертації виявлено ряд зауважень та запитань до дисертанта:

1. Доцільно було б провести аналіз стабільності комплексів «ліпосома-барвник» за умов різних температур, рН та іонної сили середовища, оскільки не зовсім зрозуміло, чи буде такий «контейнер» залишатися стабільним при потраплянні в кров'яне русло в експериментах *in vivo*.

2. У роботі не наведено дані стосовно токсичного впливу обраних флуоресцентних зондів на живі клітини, адже відомо, що органічні барвники можуть бути досить токсичними. Чи проводились подібні дослідження при підборі зондів для мічення наноконтейнерів?

3. Як можна зрозуміти з глави 4, автор не може однозначно судити чи, потрапили використані в якості «сигнальної системи» люмінофори саме всередину клітини або були акумульовані в клітинній мембрані. Чи проводились більш детальні дослідження в цьому напрямку?

4. Ліпосоми як наноконтейнер доставки речовин в організм, на мій погляд, не є оптимальним варіантом. Міцели з біосумісних полімерів, напевно, краще впораються з цим завданням. Чи проводилась апробація запропонованої «сигнальної системи» для інших типів наноконтейнерів?

5. Природно, що в тексті дисертації є й помилки, і лабораторний жаргон, і невдалі вислови на яких я не зупиняюсь.

Ці зауваження не є принциповими, жодним чином не впливають на достовірність наукових положень та висновків та не знижують високої наукової і практичної цінності роботи. Загальний рівень результатів, які одержані в дисертації, є, безумовно, високим.

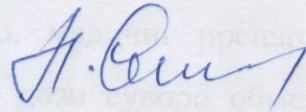
Наукова значимість представленої дисертації полягає в з'ясуванні особливостей взаємодії флуорофорів у нанооб'ємі міцел ДСН та ліпосом ФХ та впливу цієї взаємодії на їх спектральні характеристики. Отримані нові результати, які в сукупності вирішують конкретне наукове завдання та мають суттєве значення для нанобіотехнологій.

Практична значимість роботи визначається тим, що результати дослідження вказують на можливість використання запропонованої «сигнальної системи» для відстеження доставки активної речовини до живих клітин з використанням наноносіїв. Вважаю за необхідне побажати автору роботи оформити патенти на ці одержані результати.

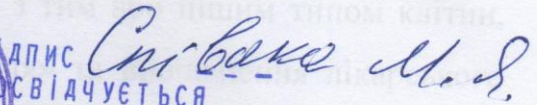
Матеріали дисертації *повністю викладено* у 7 наукових працях в авторитетних міжнародних та вітчизняних фахових журналах та доведено до відома наукової спільноти в якості доповідей на міжнародних конференціях. Основні положення дисертації *ідентично відповідають змісту автореферату.*

Висновок: вважаю, що за обсягом проведених досліджень, їх високим науковим рівнем, новизною та практичною цінністю отриманих результатів дисертаційна робота «Флуоресцентне мічення нанорозмірних контейнерів для візуалізації їх взаємодії з біологічними об'єктами» повністю відповідає всім вимогам п.9, 11 та 13 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567, які висуваються до кандидатських дисертацій, а автор роботи **Курільченко Ірина Юріївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.**

Офіційний опонент,
Завідувач відділу проблем інтерферону
та імуномодуляторів Інституту мікробіології
і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
член-кореспондент НАН України
доктор біологічних наук, професор

 М.Я.Співак




Підпис Співак М.Я.
Свідчується
ІНСПЕКТОР
Д.В.МАКАРЕЦЬ