# ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
**Курільченко Ірини Юріївни «Флуоресцентне мічення нанорозмірних контейнерів для візуалізації їх взаємодії з біологічними об'єктами»**, яку подано на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія

***Актуальність теми дослідження.*** Явище флуоресценції знайшло широке застосування в різних прикладних біологічних дослідженнях, медичній діагностиці, молекулярній біотехнології. Багато напрямків у біофізиці, молекулярній і клітинній біології виникли й розвиваються саме завдяки впровадженню нових методів, які базуються на флуоресценції. Переваги флуоресцентних методів полягають в їх відносній простоті, наочності, високій чутливості та біосумісності, можливості проведення досліджень у реальному часі, тоді як сучасне експериментальне обладнання дозоляє проводити моніторинг біологічних об'єктів навіть в експериментах *in vivo*. Одним із напрямків сучасної фармації та медицини, що бурхливо розвивається в останні десятиріччя в усьому світі, у тому числі в Україні, є застосування різних наноматеріалів та можливостей, які пропонують нанотехнології, зокрема, нанобіотехнології для створення нового покоління лікарських засобів.

Сучасні підходи ґрунтуються на використанні різних нанорозмірних носіїв для спрямованої (таргетної) доставки лікарських засобів безпосередньо в уражене місце організму, не викликаючи негативної дії на здорові органи й тканини. Однак, незважаючи на те, що провідні світові фармацевтичні компанії вже пропонують терапевтичні продукти з використанням нанорозмірних носіїв, таких, як ліпосомні везикули, полімерні міцели, полімерні кон'югати, насамперед для лікування раку, нажаль у цілому ця технологія знаходиться лише на рівні наукових пошуків та доклінічних випробувань. В розвиток зусиль багатьох дослідників, що розвивають ідею тераностики і пропонують її найбільш ефективне вирішення, спрямована задача цієї роботи. Фосфоліпідні везикули розглядаються за наноконтейнери, що можуть переносити в організмі різні форми лікарських препаратів: водорозчинні у внутрішньому об'ємі,

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна
Національної академії наук України
11 ТРА 2016
Вх.№ 419/03-07

гідрофобні розчинені в ліпідному бішарі і подібні до детергентів, що вбудовуються в полярний компонент мембрани. Ці відомі факти використовуються в багатьох спробах для ефективної цільової доставки ліків. Невистачає декількох важливих речей. Це, насамперед, розуміння того, як ліпосома вивільнює свій активний матеріал при взаємодії з клітиною, а також маркування різних композитів, що несуть ліпосоми для їх одночасного введення. Для рішення обох задач необхідне флуоресцентне мічення. І не просто мічення, а маркування ліпосоми за допомогою декількох барвників одночасно, між якими відбувається перенос енергії електронного збудження. Це дозволяє у випадку маркування «функціональних» ліпосом досягти різного багатоколірного спектру флуоресценції з (в принципі) багатьох тисяч варіантів при збудженні однією довжиною хвилі, що дуже зручно для розпізнавання ліпосом у флуоресцентній мікроскопії. Водночас, цей прийом дозволяє вивчити механізм, за яким лікарський препарат потрапляє до клітини: чи ліпосома інтерналізується з вивільненням її активного вмісту, чи її мембрана вбудовується в мембрану клітини. В першому випадку локальна концентрація барвників певний час зберігається, а в другому – дифузія барвника по мембрані, він розчиняється дифундуючи по ній, з швидкою зміною спектрів флуоресценції.

Дисертаційна робота Курільченко І.Ю. присвячена саме розробці методу флуоресцентного маркування нанорозмірних контейнерів, таких, як ліпосомні везикули або полімерні міцели, з використанням флуоресцентних барвників, які дозволяють відстежувати взаємодію наноконтейнера з живими клітинами в динаміці в експериментах *in vitro*. Результати такого роду досліджень мають безперечне значення не тільки для фармакології та медицини, але й для біонанотехнології, біосенсорики та молекулярної біології. *Тому* ***актуальність теми дисертаційної роботи не викликає сумніву***, а її результати мають конкретні ***перспективи практичного застосування.*** Слід зазначити, що дисертаційна робота виконувалася відповідно до затверджених планів науково-дослідних робіт Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України в рамках

чотирьох держбюджетних тем. Важливо також відзначити, що тема роботи безпосередньо пов'язана з таким пріоритетним напрямком розвитку науки й техніки, визначеним Верховною Радою України, як здоров'я людини.

***Обґрунтованість наукових висновків дисертації та їх достовірність*** не викликає сумнівів завдяки використанню в роботі надійних та добре розвинутих спектроскопічних методів, всебічного глибокого аналізу експериментальних результатів із використанням різних моделей. Безумовно, сильною стороною роботи є використання саме різних сучасних спектроскопічних методів. Експериментальні виміри зроблено з використанням сучасного обладнання, наявного в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України, та з застосуванням розроблених оригінальних методик приготування зразків та обробки отриманих спектральних даних.

***Наукова новизна роботи*** полягає в тому, що більшість результатів дисертації отримано вперше. Серед отриманих результатів найцікавішими, на мій погляд, ***є такі нові результати***:

1. Доведено, що концентрування декількох флуоресцентних зондів у нанорозмірному контейнері (ліпосоми фосфатіділхоліну (ФХ), міцели додецилсульфата натрію (ДСН)) дозволяє створювати композиції з безвипромінювальним перенесенням енергії електронного збудження для флуоресцентного мічення та «кодування» наноконтейнерів із різним набором смуг флуоресценції за низькі вихідні концентрації барвників у розчинах.

2. Встановлена здатність флуоресцентних зондів взаємодіяти в нанооб'ємі, що впливає на їхні спектроскопічні властивості. Це треба враховувати при створенні композицій із безвипромінювальним перенесенням енергії електронного збудження (FRET).

3. Розроблено метод оцінки накопичення флуоресцентних зондів у клітинах за зміною загальної яскравості зображень. Уперше запропоновано метод λ-ратіометричної оцінки ефективності взаємодії нанорозмірного контейнеру, що містить флуоресцентні зонди, з клітинами різних типів у динаміці з використанням мікроспектроскопії.

У цілому дисертаційна робота справляє досить позитивне враження. Рукопис складає 141 сторінку, містить 53 рисунки, 3 таблиці. Список використаних джерел складається з 157 посилань.

Відповідно до чинних вимог дисертаційна робота ***складається з вступу, чотирьох розділів та висновків***. Розділи добре структуровані, кожен закінчується висновками та посиланнями на публікації автора, у яких відображені отримані результати. Матеріали дисертаційної роботи викладено послідовно і ясно, у відповідності до існуючих стандартів наукової мови. Робота добре проілюстрована, більшість рисунків виконано якісно. Деякі експериментальні дані та виконані на їх основі розраховані параметри наведено в таблицях, що покращує сприйняття результатів досліджень у цілому.

У ***вступі*** дисертаційної роботи І.Ю. Курільченко доведена актуальність обраної для дисертаційної роботи теми досліджень, сформульовано мету та наукові завдання дисертаційної роботи, визначено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, а також наведені дані про апробацію роботи та публікації автора.

У ***першому розділі***, який є оглядом літератури за тематикою дослідження, автором критично проаналізовано сучасний стан використання флуоресцентних методів для візуалізації та дослідження біологічних об'єктів, представлено розширений критичний огляд робіт, присвячених флуоресцентному міченню ліпосомальних наноконтейнерів. У даному розділі наведено також інформацію стосовно існуючих на теперішній час нанорозмірних носіїв для доставки активних компонентів (лікарських та діагностичних речовин) у живу клітину та механізмів доставки. Проаналізовано механізми взаємодії ліпосом із живою клітиною.

Для вирішення завдань, що були поставлені в дисертаційній роботі, було розроблено оригінальні методики приготування об'єктів дослідження (міцел ДСН та ліпосом ФХ з флуоресцентними зондами) та застосовано ряд сучасних методів для дослідження їх взаємодії з клітинами різних типів, а саме: флуоресцентна спектроскопія, спектрофотометрія, лазерна флуоресцентна

спектроскопія з часовим розділенням, флуоресцентна мікроскопія та мікроспектроскопія, опису яких присвячений ***другий розділ роботи («Експериментальна техніка і методи дослідження»)***. Також у цьому розділі надано інформацію стосовно приготування біологічних об'єктів (клітин різних типів і клітинних органел), а також методики їх інкубування з наноконтейнерами.

Оцінюючи ***основні результати дисертації (розділи 3 та 4)***, відзначимо, що експериментальна частина роботи була добре спланована та систематизована. Основною метою роботи була розробка методів флуоресцентного мічення органічних наноконтейнерів (ліпосом і міцел) для візуалізації, "кодування" та моніторингу їх взаємодії з біологічними об'єктами в динаміці, тому на першому етапі роботи дисертанткою було детально вивчено взаємодію обраних флуоресцентних барвників з ліпосомами ФХ. Для характеристики процесу комплексоутворення «барвник – ліпосома» було розраховано константи зв'язування ($K_{зв}$) та термодинамічні параметри комплексоутворення ($\Delta G^0$, $\Delta H^0$ та $\Delta S^0$) для чого використовувалися стандартні методики. Аналіз отриманих параметрів дозволив зробити висновок, що комплексоутворення "барвник - ліпосома" є енергетично вигідним процесом, який пов'язаний з переходом барвника у водних розчинах з агрегованої форми до мономірної при потраплянні в ліпідні бішари ліпосом. Отримані значення констант зв'язування $K_{зв}$ і розраховані долі барвників, що зв'язались з ліпосомами (понад 100 %) указують, що процес комплексоутворення є дуже ефективним, а обрані флуоресцентні зонди – перспективні кандидати для флуоресцентного мічення наноконтейнерів.

Наступний етап роботи присвячено підбору пар флуоресцентних зондів, так звані FRET- пари для флуоресцентного мічення наноконтейнерів. Ефективні пари обирались за такими параметрами, як величина інтегралу перекриття спектру флуоресценції донора зі спектром поглинання акцептора (J, $M^{-1}см^3$), ферстеровський радіус переносу для пар барвників ($R_0$, Å), які визначалися за спектральними даними за відомими рівняннями. Із спектрів

флуоресценції за допомогою рівняння Штерна-Фольмера оцінювали ефективність гасіння флуоресценції донора при варіюванні концентрації акцептора ($K_{ШФ}$, $M^{-1}$). Аналіз отриманих параметрів дозволив автору вибрати найбільш ефективні пари флуоресцентних зондів, концентрування яких у нанооб'ємі контейнера призведе до безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження між ними. Суттєва залежність ефективності FRET від відстані між донором (Д) та акцептором (А) енергії електронного збудження і, як наслідок, перерозподіл відносної інтенсивності смуг флуоресценції Д и А при зміні відстані (наприклад, при руйнуванні контейнеру внаслідок взаємодії з клітиною) було обрано автором дисертації у якості «сигнальної системи» для мічення наноконтейнерів, яка дозволяє відстежити взаємодію в системі «наноконтейнер – жива клітина» в динаміці.

Було також проаналізовано вплив структури барвників та їх фізичних властивостей, а також розміру контейнера на ефективність FRET у парах барвників, за однакової концентрації барвників та молекул ДСН та ФХ у розчинах. Було зроблено висновок, що при однакових концентраціях барвників у розчинах ефективність FRET у ліпосомах є більшою, що пов'язано з більшою локальною концентрацією барвників у ліпосомах, ніж у міцелах. На підставі отриманих результатів було розроблено композиції з двоступеневим каскадним FRET між трьома органічними барвниками для флуоресцентного маркування наноконтейнерів.

Останній етап дисертаційної роботи присвячено практичному використанню ідей, що були запропоновані вище, а саме розвинуто ламбда-ратіометрічні підходи до детектування взаємодії FRET-мічених ліпосом із живими клітинами за допомогою мікроспектроскопії. Метод засновано на порівняльному аналізі сигналу флуоресценції на двох довжинах хвиль (максимумі випромінювання Д та А відповідно), який детектувався безпосередньо на живій клітині або клітинних органелах залежно від часу інкубації ліпосом з біооб'єктами. Проводилось тестування запропонованої "сигнальної системи" на клітинах різних типів і клітинних органелах: ізольовані

клітини гепатоцитів та ізольовані ядра гепатоцитів щурів, клітини кісткового мозку щурів, культура фібрабластів мишей, а також клітини раку молочної залози людини, чутливі та резистентні до дії цитостатиків (доксорубіцін та цицплатин). Аналіз перерозподілу в часі відносної інтенсивності смуг флуоресценції Д та А та зміни загальної яскравості флуоресцентних зображень клітин різних типів та ядер гепатоцитів за різні часи інкубації з FRET-ліпосомами однозначно вказують на суттєві відмінності в характері взаємодії ліпосом із різним типом об'єктів, що дозволило автору дисертації зробити загальний висновок про чутливість запропонованої "сигнальної системи" до характеру взаємодії ліпосоми з клітинами. Автор пояснює це різним складом компонентів плазматичних мембран клітин різних типів, їх різною в'язкістю, метаболічною та функціональною активністю клітин, а також, можливо, різними механізмами взаємодії ліпосом з клітинами різних типів.

Зазначимо, що дисертаційна робота виконана на належному науковому рівні та свідчить про достатню фахову та кваліфікаційну підготовку здобувачки. Однак, при загальній позитивній оцінці роботи варто відзначити й деякі зауваження і виниклі питання до неї. Серед результатів роботи нашу увагу привернуло наступне.

1. На Рис. 3.5 представлені результати, що демонструють значне збільшення молярного поглинання одного з ціанінових барвників, з 0,3 до ~ 0,65. Цей показник був використаний для встановлення константи дисоціації барвника. Природа такої значної зміни не обговорюється. На основний результат роботи це не впливає, оскільки автор обирає умови повного зв'язування.

2. На ст. 77 зауважено, що молярна екстинкція барвника вища в ліпосомах, ніж в міцелах детергентів. Чому?

3. Не обговорюється і форма, в якій барвник існує у воді. В цьому плані мала б бути авторська інтерпретація несподіваного результату, що при переході від водного розчину до ліпосоми ентропія не зменшується, як слід було чекати при зв'язуванні в більш впорядковану структуру, а зростає. Цікаво

було б почути пояснення диссертанта з цього питання. Наше ж припущення таке. У водному розчині барвник, що містить два ланцюги з $C_{18}H_{37}$, утворює впорядковану міцелу і насправді має місце перехід від такої міцели до ліпідного бішару.

4. На стор. 38 за текстом не зрозуміло, які лазерні голівки використовувались в експерименті: 485, чи 440 нм?

5. Відомо, що взаємодія барвника з везикулами або міцелами може здійснюватися за різними механізмами (вбудовування або розподіл), які характеризуються різними константами. Крім того, гідрофільні та гідрофобні ділянки в міцелах і везикулах суттєво відрізняються за реальними розмірами й структурою. Усі ці фактори можуть впливати на ефективність FRET між парами барвників, що треба враховувати.

6. В авторефераті дисертації (табл.1 и 2, рис.4в, 5), а також у тексті дисертації параметри, що розраховуються, і графіки, на яких наведені експериментальні точки та їх апроксимація різними рівняннями, представлені без зазначення статистичної похибки.

7. На мою думку, у дисертаційній роботі та авторефераті дисертації вжито не досить вдалі терміни, наприклад, «FRET-мічення», «FRET-ліпосоми», а також наявні деякі технічні недоліки.

Наведені зауваження суттєво не впливають на достовірність наукових висновків та не знижують загальної високої оцінки роботи.

Аналіз роботи та опублікованих здобувачкою в співавторстві наукових праць дає змогу зробити висновок, що дисертаційна робота І.Ю. Курільченко ***є завершеним науковим дослідженням***, у якому успішно виконано поставлені завдання та отримані нові достовірні експериментальні результати, що в сукупності ***роблять вагомий внесок*** у розвиток галузі біотехнології, що пов'язана з розробкою наукових основ створення біосенсорних систем.

***Наукова значущість*** дисертації полягає в отримані нових фундаментальних даних стосовно взаємодії молекул у нанооб'ємі, які можуть

бути використані при розробці нових нанорозмірних гібридних флуоресцентних матеріалів для використання в нанобіотехнології.

***Практична значущість*** роботи ґрунтується на тому, що методи FRET-мічення та «кодування» нанооб'єктів, запропоновані автором, можуть бути використані при розробці нових наноконтейнерних форм лікарських засобів.

Основні результати роботи майже повністю викладено в ***7 статтях,*** надрукованих у міжнародних та вітчизняних фахових журналах, та ***тезах 4-х доповідей*** на міжнародних і вітчизняних конференціях.

Тема дисертації ***відповідає спеціальності*** 03.00.20 – біотехнологія. ***Автореферат*** цілком відображає зміст дисертації.

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. Авторка роботи ***Курільченко Ірина Юріївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.***

Офіційний опонент, завідувач лабораторією нанобіотехнологій
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
доктор біологічних наук, ст.н.с. О.П. Демченко

Підпис О.П. Демченка ЗАСВІДЧУЮ.

……..

Підпис О.П. Демченка
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"11" 05 2016 р.

Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
ідентифікаційний код 05417288
м. Київ