

ВІДГУК

офіційного опонента **Фрасинюка Михайла Сергійовича**

на дисертаційну роботу **Синюгіної Агнеси Тарасівни**

“Внутрішньоіонні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії”, поданої
на здобуття наукового ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність вибраної теми. Найвищу ефективність для біологічної візуалізації мають поліметини, що випромінюють світло в довгохвильовій частині спектрального діапазону. Для ряду досліджень надзвичайно важливим є використання внутрішньоіонних поліметинових барвників, які не мають загального електричного заряду на флуорофорі, або ж внутрішній заряд скомпенсований всередині молекули. Кон'югати нейтральних або цвіттеріонних барвників з лігандами дають змогу реалізувати їхню адресну доставку до потрібних молекулярних мішеней. Основна увага при дослідженні мероціанінів приділяється барвникам із мезо-незаміщеним поліметиновим ланцюгом. Вплив мезо-замісників у поліметиновому ланцюзі на взаємодію барвників із сироватковими альбумінами та проникність в клітини практично не вивчений. Розробка та дослідження нових внутрішньоіонних барвників, проведені дисертанкою, значно розширюють практичні можливості для флуоресцентної візуалізації клітин та дизайну адресних флуоресцентних кон'югатів.

Загальні відомості про структуру дисертації та аналіз її змісту.

Дисертаційна робота Синюгіної Агнеси Тарасівни виконана на 162 сторінках друкованого тексту, включає анотацію, вступ, 5 розділів, загальні висновки, перелік використаних джерел (181 посилання). Робота ілюстрована 75 рисунками та 9 таблицями.

У **першому розділі** дисертації авторка наводить аналіз сучасного стану досліджень в області флуоресцентної візуалізації біологічних об'єктів за допомогою поліметинових барвників. Авторкою проаналізовано вплив хімічної структури цих барвників на їхні спектральні властивості та

відмічено, що в літературі особлива увага зосереджена на дослідженні барвників із мезо-незаміщеним поліметиновим ланцюгом, який здатний до негативного ефекту ізомеризації, а також те, що практично не відображений вплив мезо-замісників у поліметиновому ланцюзі на взаємодію із сироватковими альбумінами та клітинну проникність.

У другому розділі наведено методики експериментальних досліджень, фізико-хімічні та спектральні характеристики одержаних барвників, визначення їх цитотоксичності. Також приведені результати визначення константи зв'язування барвників з альбумінами, а також методики візуалізації живих клітин.

Третій розділ присвячено синтезу та вивченню спектрально-флуоресцентних властивостей мероціанінових барвників. Авторкою показано, що структура мезо-замісника в поліметиновому ланцюзі впливає не лише на спектральні властивості барвників, а також на їх здатність до нековалентної взаємодії із альбумінами, а саме підвищення ліпофільності сприяє утворенню більш стійких асоціатів у водному середовищі, які не встигають зруйнуватися за присутності альбуміну в умовах експерименту. Знайдено два мероціанінових барвники, які мали хорошу розчинність у водному буфері та високу власну флуоресценцію й гарну проникність у клітини, частково колокалізувалися із мітохондріями, а також фарбували інші органели цитоплазми. Представлені барвники можуть використовуватися як потенційні реагенти для візуалізації клітин, а також як пришивочні зонди для вивчення біорозподілу невеликих молекул.

Четвертий розділ присвячено синтезу та вивченню спектрально-флуоресцентних властивостей внутрішньоіонних сквараїнових барвників з як нейтральними N,N' -замісниками, так і з зарядженими. Знайдені барвники, які можуть використовуватися як потенційні реагенти для візуалізації клітин. Авторкою відмічено, що барвники із N,N' -алкільними гідрофобними бічними замісниками проявили тенденцію до агрегації у водному буфері, проте агрегати руйнувалися в присутності сироваткових альбумінів та той факт, що агрегація сквараїнів, яка, як правило, небажана у медико-біологічних

експериментах, може відігравати корисну роль для сенсibilізації синглетного оксигену.

У п'ятому розділі приведені результати досліджень кон'югатів мероціанінових та сквараїнових барвників з біологічно важливими молекулами. Відмічено, що кон'югат мероціанінового барвника продемонстрував гарну інтенсивність флуоресценції в ракових клітинах MCF-7, незважаючи на гіршу розчинність у воді та менші значення квантового виходу флуоресценції у водному середовищі порівняно з вільним барвником.

Наукова новизна дослідження та отриманих результатів.

Наукова новизна роботи не викликає сумнівів. Хотів би відзначити декілька принципових її моментів.

- Досліджені спектральні властивості ряду мероціанінових барвників із жорстко закріпленими мезо-замісниками в поліметиновому ланцюзі, як у вільному стані, так і в присутності глобулярних білків.
- Вивчені спектральні властивості низки сквараїнових барвників з N,N' -алкільними замісниками різної іонності та ліпофільності. Показано, що введення мезо-замісника в поліметиновий ланцюг мероціанінових барвників підвищує фотостійкість молекули, впливає на ефективність зв'язування із людським сироватковим альбуміном. Також встановлено, що хімічна природа N,N' -алкільних замісників впливає на їхнє зв'язування із альбумінами, проникнення в клітини, на їх здатність до генерації активних форм оксигену.

Ступінь обґрунтованості наукових результатів та положень

Експериментальні дослідження виконані на високому науковому рівні. Це забезпечено використанням комплексу сучасних синтетичних підходів та фізико-хімічних методів дослідження. Індивідуальність та будова нових сполук надійно доведена та обґрунтована даними хроматомас-спектрометрії, ^1H та ^{13}C ЯМР спектроскопії, флуоресцентної спектроскопії, електронної спектроскопії поглинання, конфокальної та флуоресцентної мікроскопії.

Наукові положення, висновки і рекомендації, пояснення шляхів перебігу досліджуваних реакцій та впливу різноманітних факторів на їх направленість є повністю обґрунтованими і достовірними. Висновки за окремими розділами та загальні висновки є науково обґрунтованими, викладені чітко і коректно. Наведені на схемах та рисунках хімічні перетворення є коректними та достовірними.

Академічна доброчесність. Порухень принципів академічної доброчесності у тексті дисертаційної роботи Синюгіної Агнеси Тарасівни не виявлено. Результати досліджень, на основі яких написана ця дисертаційна робота, опубліковані в міжнародних та фахових рецензованих журналах.

Практична цінність роботи. Отримані дисертанткою при виконанні роботи результати є практично цінними, оскільки розроблені нові реагенти для флуоресцентної візуалізації клітин на основі внутрішньоіонних мероціанінових та сквараїнових барвників. Запропонований потенційний фотосенсибілізатор на основі сквараїнового барвника, що характеризується збудженням у довгохвильовій частині спектру та має високу світлову токсичність.

Зауваження та загальна оцінка роботи. Характеризуючи дисертаційну роботу в цілому, необхідно зазначити, що вона викликає позитивну оцінку – авторкою виконано об'ємне експериментальне дослідження, яке має теоретичну та практичну цінність. Актуальність обраної теми, обґрунтованість наукових положень та висновків, достовірність та наукова новизна одержаних результатів, повнота їх викладу в опублікованих провідних міжнародних журналах свідчать про високий науковий рівень дослідження. Проте існують деякі несуттєві недоліки та зауваження, які стосуються оформлення дисертації:

- На мій погляд, віднесення деяких сигналів в ^{13}C спектрах є недоцільним, оскільки не проводились спеціальні дослідження.
- Незрозумілим є позначення “J1” у описі сполук, оскільки таке позначення використовується для константи спін-спінової взаємодії

через відповідну кількість зв'язків, а для органічних сполук це, як правило, може бути ^1H - ^{13}C КССВ, яка складає сотні герц.

Зазначені вище зауваження не торкаються суті дисертаційної роботи та не знижують її цінність та достовірність.

Висновок про відповідність дисертації умовам положення. За результатами аналізу дисертаційної роботи **Синюгіної Агнеси Тарасівни** на тему *“Внутрішньоклітинні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії”*, наукових публікацій, в яких висвітлені основні її положення, можна зробити висновок, що за обсягом проведених досліджень, актуальністю, науковою новизною, практичною значимістю, ступенем обґрунтованості наукових положень та висновків вона повністю відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (з наступними змінами) та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року, а її авторка **Синюгіна Агнеса Тарасівна** заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

старший науковий співробітник відділу
хімії біоактивних азотомісних гетероциклічних
основ Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії
ім. В. П. Кухаря НАН України,

доктор хімічних наук,

старший науковий співробітник

 Михайло ФРАСИНЮК

