

**Голові спеціалізованої вченої ради
у Інституті молекулярної біології і генетики
НАН України
доктору біологічних наук,
старшому науковому співробітнику,
провідному науковому співробітнику
відділу біомолекулярної електроніки
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України
Сергєєвій Тетяні Анатоліївні**

ВІДГУК

**офіційного опонента – доктора біологічних наук, старшого дослідника,
старшого наукового співробітника відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
Векліч Тетяни Олександрівни
на дисертацію Синюгіної Агнеси Тарасівни на тему
«ВНУТРІШНЬОІОННІ БАРВНИКИ ЯК ЗОНДИ ДЛЯ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ КЛІТИН І ПОТЕНЦІЙНІ
РЕАГЕНТИ ДЛЯ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ»
подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 – Біологія (09 – Біологія)**

Актуальність обраної теми дисертації. Методи та матеріали для виявлення та візуалізації біологічних об'єктів необхідно постійно вдосконалювати. Безпечними та зручними є технології флуоресцентної діагностики, котрі дозволяють вивчати різноманітні біологічні процеси. Дані літератури вказують на те, що найвищу ефективність для біовізуалізації мають поліметинові барвники, які характеризуються яскравістю, високими квантовими виходами флуоресценції, біосумісністю та можливістю хімічної модифікації їх структури в залежності від потреб використання. Втім, катіонні поліметинові барвники мають здатність селективно накопичуватися в мітохондріях, що, в свою чергу, не дає змоги сконструювати кон'югати для таргентної доставки потрібних молекул в певні компартаменти клітини. Для проведення дизайну адресних флуоресцентних кон'югатів необхідним є

дослідження внутрішньоіонних поліметинів, зокрема мероціанінових та сквараїнових барвників. Однак їхні властивості досліджені недостатньо. Тому актуальним є розробка довгохвильових барвників, які не проявлятимуть здатності до селективного накопичення в органелах клітин.

Усе викладене і визначає актуальність теми дисертаційної роботи Синюгіної Агнеси Тарасівни, присвяченої пошуку нових реагентів для візуалізації клітин і фотодинамічної терапії на основі внутрішньоіонних барвників.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалася в рамках гранту Європейського Союзу «Горизонт 2020» дослідної й інноваційної програми імені Марії Складовської-Кюрі “NoBiasFluors”, №872331 (2020 – 2024 рр.).

Компоненти аналізу цієї дисертаційної роботи опонентом, які дозволили мені скласти враження щодо неї, є наступні:

- 1) звичайно, опонент читав дисертацію, розмірковував над науковими результатами, що були одержані дисертанткою;
- 2) перед написанням цього «Відгуку» мною були проаналізовані головні публікації дисертантки;
- 3) опонент безпосередньо обговорював з дисертанткою результати її експериментальних досліджень.

Таким чином, на підставі проведеного мною аналізу цієї дисертаційної роботи, та, відповідно до вимог ДАК МОН України, формулюю свої уявлення щодо найбільш важливих науково-теоретичних та практичних аспектів дисертаційної роботи Синюгіної А.Т.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Ступінь надійності одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є, на мій погляд, вельми високим. Результати дисертаційного дослідження Синюгіної А.Т. є достовірними та об'єктивними.

Вступ до дисертації написано послідовно і лаконічно. У ньому автор розкрила суть проблеми, обґрунтувала актуальність теми, окреслила мету і завдання дослідження, висвітлила наукову новизну і власний внесок, а також навела об'єкт, предмет і методи дослідження, вказала публікації та апробацію результатів дисертаційного дослідження.

Грунтовний аналіз сучасних даних літератури, представлений у першому розділі рукопису дисертаційної роботи, включає огляд впливу структури поліметинів на їх властивості для використання у біовізуалізації, взаємодії флуорофорів з альбумінами, а також гарно проаналізовано вплив взаємодії барвників із альбумінами на їх фотодинамічні властивості. Узагальнення даних літератури дало змогу автору виокремити недосліджені аспекти проблеми, що вивчалися, і сформулювати мету і завдання власного дослідження.

Другий розділ дисертаційної роботи містить опис методів дослідження. Обґрунтовано та коректно використано дисертантом необхідних як класичних, так і сучасних експериментальних методів: органічного синтезу, флуоресцентної спектроскопії, електронної спектроскопії поглинання, конфокальної та флуоресцентної мікроскопії, проточної цитометрії, молекулярного докінгу. Статистична обробка та математичний аналіз отриманих результатів проведені з використанням сучасних методів, адекватних поставленим завданням.

Викладення власних експериментальних результатів, отриманих за допомогою використаних методів, логічно пов'язано з метою та завданнями досліджень. Результати експериментальних досліджень представлені в трьох розділах (Розділи 3, 4 і 5).

У розділі 3 наведені результати дослідження п'яти нових синтезованих мероціанінових барвників із жорсткозакріпленими фрагментами в поліметиновому ланцюзі. Також автором було показано, що введення мезо-фрагменту в поліметиновий ланцюг надає барвникам фотостійкості та сприяє батохромному зміщенню максимумів поглинання.

У розділі 4 був описаний синтез та проведене дослідження симетричних сквараїнових барвників з індоленіновими та бензіндоленіновими гетероциклами із замісниками, що містять гідрофобні і гідрофільні групи при гетероатомі. У цій частині роботи ґрунтовно досліджено взаємодію сквараїнових барвників із глобулярними білками спектрально-флуоресцентними методами. Варто відзначити цікаві результати, наведені у пункті 4.6, де автор показав що, зв'язування барвника **4.5** із бичачим сироватковим альбуміном приводить до зростання інтенсивності флуоресценції майже в 500 разів.

У розділі 5 описано проведений синтез кон'югатів із глюкозаміном **3.4-GlcN** та **4.3-GlcN** на основі мероціанінового і сквараїнового барвників, досліджено спектральні властивості кон'югатів, а також їх проникнення у клітину. Показано, що симетричний сквараїновий кон'югат не візуалізується в клітинах, тоді як несиметричний мероціаніновий кон'югат проникає в клітини MCF-7 та візуалізує їх.

Висновки дисертаційної роботи відповідають її змісту та поставленій меті, ґрунтуються на значному фактичному матеріалі, комплексному статистичному аналізі отриманих даних і не викликають сумнівів.

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій підтверджено їх обговоренням на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Дисертація Синюгіної А.Т. «Внутрішньоіонні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії» є закінченою кваліфікаційною роботою, в якій отримано нові та доповнено існуючі наукові результати, що мають теоретичну і практичну

цінність.

Достовірність і новизна основних наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки дисертаційної роботи Синюгіної А.Т. побудовані на матеріалах власних досліджень з використанням традиційних і сучасних методів досліджень є цілком достовірними.

На основі одержаного експериментального матеріалу логічно сформульовані основні положення та висновки, новизна яких в наступному.

Агнеса Тарасівна вперше дослідила ряд мероціанінових барвників із жорстко закріпленими мезо-замісниками в поліметиновому ланцюзі, а також ряд сквараїнових барвників із бічними замісниками різної йонності та ліпофільності. В дисертаційній роботі проведений синтез мероціанінових та сквараїнових барвників, проаналізовано вплив будови флуорофорів на їх зв'язування із глобулярними білками, внутрішньоклітинний розподіл та здатність до генерації синглетного кисню.

Розглядаючи основні питання наукової новизни представленої в дисертації, необхідно відзначити, що автор вперше встановив, що що введення дифеніламіно-групи в мезо-замісник поліметинового ланцюга барвника **3.4** підвищує константу зв'язування з людським альбуміном в 30 разів в порівнянні із мезо-незаміщеним барвником **3.0**. Результати, отримані методом молекулярного докінгу флуоресцентних зондів **4.5** та **4.7** по всій поверхні молекули бичачого сироваткового альбуміну вказують на те, що наявні 5 найбільш імовірних кишень зв'язування, що є спільними для обох флуоресцентних зондів та вказують на переважно гідрофобну взаємодію барвників із сайтами зв'язування BSA.

Дисертаційне дослідження Синюгіної А.Т. «Внутрішньоіонні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії» має також суттєвий прикладний аспект. Так,

синтезовані нові флуоресцентні барвники, які є перспективними мітками та зондами через можливість використання в області низької автофлуоресцентної інтерференції. Також був запропонований потенційний фотосенсибілізатор на основі скварайнового барвника, що характеризується збудженням у довгохвильовій частині спектру, та здатний до флуоресцентної візуалізації клітин.

Практичне значення роботи.

Дисертаційна робота Синюгіної Агнеси Тарасівни має важливе практичне значення, оскільки розроблені нові реагенти для флуоресцентної візуалізації клітин на основі внутрішньоіонних мероціанінових та скварайнових барвників. Барвники збуджуються червоним світлом, що робить їх перспективними мітками та зондами через можливість використання в області низької автофлуоресцентної інтерференції.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях.

Основні результати дисертаційної роботи достатньо повно викладено в 10 авторських публікаціях: 5 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України (серед них 4 публікації у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Scopus); 5 тез наукових доповідей. Крім цього, основні наукові положення дисертаційної роботи апробовані на наукових конференціях.

Щодо відповідності дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Синюгіної А.Т. є завершеною науковою працею і її оформлення відповідає встановленим вимогам. Зміст анотації відповідає основним положенням дисертації та не містить інформації, яка була б відсутня у рукописі дисертації. Анотація написана українською та англійською мовами та в повній мірі відображає основні результати

дисертації. Використані у дисертації ідеї та результати інших авторів мають відповідні посилання на джерела літератури. Анотацію та текст рукопису дисертації оформлено відповідно до діючих вимог. Агнесою Тарасівною дотримано вимоги норм законодавства про авторське право.

Оцінка змісту дисертації.

Дисертаційна робота Синюгіної А.Т. є фундаментальним науковим дослідженням. Викладена на 162 сторінках, основна частина роботи викладена на 111 сторінках. Робота добре оформлена і проілюстрована 9 таблицями та 75 рисунками. Структура дисертації повністю відповідає меті і завданням дослідження і складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних експериментальних досліджень з їх обговоренням, висновків, списку використаних літературних джерел (181 посилання). У тексті дисертації відсутнє порушення вимог академічної доброчесності.

Висновки відображають основні одержані результати і базуються на аналізі експериментальних даних.

Зауваження до дисертаційної роботи:

Слід зазначити, що дисертація написана дуже грамотно не лише з наукової, але й з орфографічної та стилістичної точки зору. Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому позитивно, хотілося б висловити деякі побажання, зауваження та отримати відповіді на деякі запитання:

Побажання та зауваження.

1. В кінці дисертаційної роботи був би бажаний короткий узагальнюючий розділ, де Ви могли б сфокусувати увагу на вирішених Вами завданнях та планах на майбутнє.

2. В роботі наведено дуже багато експериментальних результатів, але наукова новизна одержаних результатів написана дуже скромно.

3. В роботі розмірність для концентрації зустрічається українською і англійською мовами (μM , mkM , mкM) (стор. 88-89), треба в усіх випадках писати її однаково.

4. На рис. 4.28 і 4.29 всі підписи англійською мовою, тоді як інші рисунки з підписами українською мовою. На майбутнє, краще їх уніфікувати по одному зразку.

5. Після підпису рисунку має бути пропуск рядка, інакше підпис зливається з текстом дисертації (наприклад, як у рис. 1.11).

Запитання.

1. Вами були вивчені фотодинамічні властивості сквараїнових барвників, а чи не досліджували Ви фотодинамічні властивості мероціанінових барвників?

2. Ви показали, що нековалентне зв'язування барвника **4.5** із бичачим сироватковим альбуміном приводить до зростання інтенсивності флуоресценції майже в 500 разів, тоді як інші представники сквараїнів продемонстрували зростання лише у 8-14 разів. Як Ви вважаєте, з чим пов'язане таке сильне зростання інтенсивності флуоресценції?

3. Чи можливе зв'язування Ваших барвників з РНК після проникнення в клітину?

Втім, вищезазначені запитання та зауваження мають лише дискусійне значення і ніякою мірою не впливають на загальну надзвичайно високу оцінку дисертації в цілому, а також викладених дисертантом основних наукових положень та висновків.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Синюгіної Агнеси Тарасівни «Внутрішньоіонні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії» виконана у Інституті молекулярної біології і генетики НАН України і є самостійною завершеною дослідною роботою у галузі науки 09 Біологія (спеціальність 091 – “Біологія”), в якій

отримані нові науково обґрунтовані експериментальні дані, що в сукупності є суттєвими для розуміння синтезу та властивостей нових внутрішньоіонних поліметинів на основі мероціанінових та сквараїнових барвників як реагентів для візуалізації клітин і фотодинамічної терапії.

Оформлення дисертації відповідає діючим нормативним документам. Отримані Агнесою Тарасівною результати мають як теоретичну, так і практичну цінність. Зроблені зауваження ні в якому разі не знижують значення отриманих результатів і не впливають на загальну високу оцінку роботи.

Отже, за актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску дослідника і зроблених висновків дисертаційна робота на тему: «Внутрішньоіонні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії» відповідає спеціальності 091 – Біологія та вимогам «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 12.01.2022 року, а її автор Синюгіна Агнеса Тарасівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:
 Старший науковий співробітник
 Відділу біохімії м'язів
 Інституту біохімії
 ім. О.В.Палладіна НАН України,
 доктор біологічних наук,
 старший дослідник



Тетяна ВЕКЛІЧ

