

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента – доктора хімічних наук, завідувача відділу
синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України Дубея Ігоря Ярославовича
на дисертацію Синюгіної Агнеси Тарасівни
*«Внутрішньойонні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і
потенційні реагенти для фотодинамічної терапії»*,
подану до захисту у разову спеціалізовану вчену раду в Інституті
молекулярної біології і генетики НАН України
на здобуття наукового ступеня доктора філософії
у галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія»

Актуальність теми дисертації

Дисертаційна робота А.Т. Синюгіної присвячена пошуку й дослідженню нових флуоресцентних барвників внутрішньойонного типу на основі скваоаїнів та мероціанінів як реагентів для візуалізації клітин та фотодинамічної терапії.

Вибір теми дослідження обґрунтований, а її актуальність не викликає сумнівів. Останні успіхи наук про життя, медицини та біотехнології, значною мірою зумовлені розвитком флуоресцентних технологій. На них ґрунтуються найбільш чутливі та інформативні методи детекції та кількісного визначення біомолекул, вивчення їхньої структури, функцій, метаболізму та взаємодій з іншими біологічними та синтетичними молекулами. Важливо, що флуоресцентні мітки забезпечують чутливість детекції, співставиму з радіоактивними (10^{-18} моль і менше), і при цьому цілком безпечні та зручні в роботі.

Сполуки родини ціанінів відомі як флуоресцентні барвники, що широко застосовуються в молекулярно-біологічних, біохімічних і медичних дослідженнях. Їх сферами використання є флуоресцентне мічення біомолекул, візуалізація білків і нуклеїнових кислот в електрофоретичних гелях, у розчині та в клітині, фотодинамічна терапія. Так, широко відомі комерційні реагенти цього класу – монометинціаніни TO, YO, SYBR Green I/II, PicoGreen, три- та пентаметинціаніни Cy3 та Cy5, що використовуються насамперед для детекції ДНК та РНК, барвники для детекції білків SYTO та ін. Зв'язування ціанінів з біомолекулами часто супроводжується різким зростанням емісії, що й лежить в основі візуалізації біомолекул та клітин. Найпривабливішими для використання в біології є довгохвильові флуорофори, що випромінюють у червоному та близькому інфрачервоному спектральному діапазоні (650-900 нм), в якому мінімальна фонові автофлуоресценція біомолекул.

В медико-біологічних дослідженнях застосовують передусім катіонні метинціаніни, до яких належать і вказані вище реагенти. Проте заряджені барвники мають ряд важливих недоліків. Внесення заряду в молекулу часто знижує селективність взаємодії барвник-біомолекула. Крім того, заряджені

барвники мають тенденцію до накопичення в мітохондріях, що ускладнює візуалізацію інших компартментів клітини чи адресну доставку. Довгохвильові флуоресцентні барвники, що є незарядженими чи в яких заряд внутрішньо скомпенсований (цвіттер-йонні, або бетаїнові) дозволяють обійти ці обмеження. Катіонні поліметинові барвники надзвичайно широко досліджувалися протягом тривалого часу, тоді як нейтральні чи внутрішньойонні ціаніни вивчені в біології зовсім недостатньо. Виходячи з цього, пошук нових флуоресцентних зондів для візуалізації клітин, а також фотосенсибілізаторів для фотодинамічної терапії на основі таких барвників важливий як з наукового, так і з практичного погляду.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконувалась у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Робота відповідає основному плану НДР відділу та виконана в рамках гранту Європейського Союзу “Горизонт-2020” No. 872331 Науково-інноваційної програми імені Марії Склодовської-Кюрі “NoBiasFluors” (2020-2024 pp.).

Загальна структура дисертації

Дисертація викладена на 162 сторінках і складається з анотації, вступу, 5 розділів, висновків і списку використаних джерел, що включає 181 посилання, а також додатку (список публікацій здобувача за темою дисертації). Робота містить 75 рисунків і 9 таблиць.

Аналіз основного змісту роботи

В цілому, в роботі розглянуто два класи ціанінових барвників – мероціаніни та скварайни. При цьому вивчалися дво основних аспекти реагентів обох класів – спектрально-флуоресцентні властивості барвників та їх комплексів з білками й можливості флуоресцентної візуалізації клітин за допомогою досліджуваних барвників. Для ряду барвників досліджували також фотодинамічні властивості.

Перший розділ дисертації – літературний огляд, який присвячений розгляду різних аспектів хімії, біології та біофізики поліметинових барвників. Зокрема, розглянуто спектрально-флуоресцентні властивості барвників, їх використання для візуалізації біологічних об'єктів, вплив структурних факторів на спектральні характеристики барвників. Також розглянуто їх взаємодію з альбумінами. Значну увагу в огляді присвячено фотодинамічним властивостям поліметинових барвників та їхньому застосуванню як фотосенсибілізаторів у фотодинамічній терапії. Огляд літератури актуальний, добре організований і справляє позитивне враження та свідчить про хороше володіння дисертантом темою свого дослідження.

В наступних розділах представлено результати власних досліджень автора.

У **другому розділі** (“Матеріали і методи”) описано основні експериментальні та *in silico* методи, що використовувались при проведенні досліджень. Наведено методики синтезу барвників, описано методики спектрально-флуоресцентних досліджень, визначення констант зв'язування барвників з білками, протоколи

флуоресцентної візуалізації живих та фіксованих клітин, проточної цитометрії, оцінки цитотоксичності сполук. В цьому ж розділі описано методи молекулярного моделювання (докінг, молекулярна динаміка), а також статистичного аналізу експериментальних даних.

Третій розділ роботи присвячений мероціаніновим барвникам. В ньому описано синтез нових барвників цього класу і широко досліджено їх спектрально-флуоресцентні властивості у вільному стані та в комплексах з різними глобулярними білками. Вивчено проникнення барвників у клітини, їхню клітинну локалізацію та цитотоксичність, продемонстровано можливість використання мероціанінів як зондів для візуалізації клітин у флуоресцентній мікроскопії. Слід зазначити, що про поведінку мероціанінів у біологічних системах відомо досить мало. Проведено докінг барвника по всій поверхні молекули сироваткового альбуміну людини для визначення можливого способу зв'язування. Тут хотілось би відзначити досить широке застосування в даній роботі методів молекулярного моделювання, які поступово стають невід'ємним елементом дослідження взаємодій біомолекул з лігандами.

У **четвертому розділі дисертації** розглянуто сквараїни. Це цікавий клас цвіттер-йонних ціанінових барвників, що містять у поліметиновому ланцюгу 4-членний цикл, що суттєво обмежує конформаційну рухливість молекули. Як і у випадку мероціанінів, описано хімічний синтез індоленінових і бензіндоленінових сквараїнових барвників та їхні спектральні властивості у вільному стані та в комплексах з різними білками. Показана можливість успішного використання сквараїнів як реагентів для флуоресцентної мікроскопії. Визначено константи зв'язування ряду барвників з білками, проведено докінг барвника по всій поверхні молекули бичачого сироваткового альбуміну.

Важливою частиною даного розділу роботи є дослідження фотодинамічної активності сквараїнових барвників.

Особливо цікавим, на наш погляд, є **п'ятий розділ роботи**, присвячений вже значно складнішим об'єктам, а саме синтезу й дослідженню кон'югатів барвників з глюкозаміном. Для проведення біокон'югації використовували функціоналізовані похідні мероціанінів і сквараїнів. Досліджено спектрально-флуоресцентні властивості кон'югатів барвників двох класів у порівнянні з вільними барвниками, а також проникнення цих кон'югатів у пухлинні клітини лінії MCF-7 з використанням флуоресцентної мікроскопії. При цьому симетричний кон'югат сквараїну виявився малоприсадним для візуалізації клітин, тоді як несиметричний мероціаніновий аналог добре проникає в пухлинні клітини та візуалізує їх. Цьому дано досить переконливе пояснення.

Достовірність отриманих результатів

Достовірність результатів дисертаційної роботи не викликає сумнівів. Вона підтверджується використанням адекватних та сучасних експериментальних і розрахункових методів досліджень. Вони включають методи органічного синтезу й аналізу (^1H - і ^{13}C -ЯМР, мас-спектрометрія), спектральні методи (адсорбційна та

флуоресцентна спектроскопія), флуоресцентну мікроскопію, та проточну цитометрію, фотохімічні методи, а також підходи молекулярного моделювання (докінг, молекулярна динаміка) для вивчення взаємодій барвників з білками. Коректно проведена статистична обробка даних. Застосовані методи дозволили отримати достовірні результати, на яких ґрунтуються зроблені в роботі висновки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків дисертації

Матеріали дисертації викладено у відповідності з метою й завданнями дослідження, які чітко сформульовані. Автором проведений ґрунтовний аналіз літератури за темою роботи, що дало змогу виявити наукову новизну одержаних результатів. Застосування вказаних вище методів дозволило вирішити проблеми, що лежали в основі дослідження. Висновки роботи чітко сформульовані та висвітлюють її основний зміст. Наукові положення та висновки дисертації добре обґрунтовані й відповідають отриманим результатам.

Наукова новизна роботи

Наукова новизна роботи очевидна. Основними досягненнями тут є наступні.

В роботі отримано ряд нових барвників. Вперше досліджено спектрально-флуоресцентні властивості ряду барвників різних класів, зокрема, мероціанінових барвників із жорстко закріпленими *мезо*-замісниками в поліметиновому ланцюзі, а також ряд сквараїнових барвників із N,N'-замісниками різної йонності та гідрофобності. Визначено вплив структурних факторів на спектральні властивості барвників. Так, показано, що введення *мезо*-замісника в поліметиновий ланцюг мероціанінів не тільки впливає на спектральні характеристики та на зв'язування з альбуміном, але й підвищує фотостабільність барвників. Визначено константи зв'язування ряду барвників з білками. При цьому на основі даних молекулярного докінгу запропоновано можливі способи зв'язування барвників з білками.

Вперше отримано й досліджено флуоресцентні кон'югати глюкозаміну з мероціаніновими та сквараїновими барвниками.

Продемонстровано потенційну можливість використання сквараїнових барвників як реагентів для фотодинамічної терапії. Показано вплив структурних факторів на здатність барвників генерувати активні форми кисню. При цьому встановлений незвичний ефект позитивної ролі агрегації сквараїнового барвника в сенсibiliзації активних форм кисню.

Практичне значення отриманих результатів

Практичне значення дисертаційної роботи полягає передусім у виявленні нових чутливих зондів для флуоресцентної візуалізації клітин на основі внутрішньойонних мероціанінових і сквараїнових барвників. Важливо зазначити, що запропоновані барвники поглинають у довгохвильовій області (понад 600 нм), мають низьку цитотоксичність та добре проникають у клітину. При цьому при зв'язуванні барвників з білками спостерігається значне зростання флуоресценції – деколи в сотні разів. Безумовно, ці реагенти зможуть знайти застосування в біохімії, молекулярній та клітинній біології, а також у медичній діагностиці.

Запропоновані фотосенсибілізатори на основі скварайнів зі збудженням у довгохвильовій області спектру та високим рівнем фототоксичності, на основі яких потенційно можуть бути розроблені препарати для фотодинамічної терапії пухлин.

Повнота викладу основних результатів роботи в опублікованих працях

Результати роботи повністю опубліковані. За її матеріалами вийшло друком 10 наукових праць, у т.ч. 5 статей у фахових журналах та 5 тез доповідей на конференціях. Зокрема, 2 статті опубліковано в міжнародних журналах *Journal of Photochemistry and Photobiology* та *Theoretical and Experimental Chemistry*. Це свідчить про високий рівень досліджень, наукову новизну й вагомість отриманих результатів.

Загальна оцінка змісту дисертаційної роботи

Робота справляє дуже позитивне враження. Дисертантом виконано великий обсяг досліджень, що дозволило знайти нові ефективні реагенти для розв'язання ряду біохімічних та біомедичних задач. Результати мають як фундаментальну наукову, так і практичну цінність. Вони зможуть знайти застосування в наукових дослідженнях у науках про життя, в медичній діагностиці, а в перспективі і в терапевтичній медицині. Сформульовані автором мета і завдання роботи успішно реалізовані. Висновки обґрунтовані, анотація відповідає змісту і основним положенням дисертації. В цілому, дисертаційна робота є серйозною науковою працею на актуальну тему, виконаною на сучасному експериментальному й теоретичному рівні, в якій отримано нові результати, важливі для розвитку біології та медицини.

Дискусійні положення та зауваження до дисертації

Робота за своїм змістом, результатами і глибиною їх аналізу є дослідженням високого рівня. Принципових зауважень до неї немає, а серед окремих зауважень і запитань можна навести наступні.

1. Кожен розділ дисертації закінчується висновками до цього розділу. Разом з тим, робота значно виграла би, якби в неї було включено невелику заключну частину, де було б узагальнено наведені в попередніх розділах результати, проведено безпосереднє порівняння барвників двох класів у різних контекстах (інтенсивність флуоресценції, ефективність зв'язування з білками, проникнення у клітину, тощо).

2. Практичне значення отриманих результатів подано надто стисло (с. 18), насправді їхня практична цінність значно ширша. Це частково стосується і представлення наукової новизни результатів у Вступі (с. 17-18), яка більш повно викладена в анотації та Висновках.

3. Список умовних позначень слід було подати за алфавітом

4. Робота написана гарною літературною мовою, але зрідка зустрічаються й описки, на яких не варто зупинятися. Часом трапляються невдалі чи не зовсім строгі терміни. Наприклад: “електронна спектроскопія поглинання” (с. 17) – прийняті терміни “електронна спектроскопія” або “адсорбційна спектроскопія”;

“константа рівноваги зв’язування” (с. 58) – правильно говорити просто “константа зв’язування”.

Ці зауваження не стосуються суті роботи та жодним чином не впливають на її загальну високу оцінку.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Представлена до захисту дисертація є самостійною завершеною науковою працею, що становить вагомий внесок як у галузь флуоресцентних барвників, так і в науки про життя. Актуальність теми роботи, достовірність, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, повнота їх викладу в опублікованих працях, обґрунтованість положень і висновків дисертації свідчать про її високий науковий рівень. Автор роботи є висококваліфікованим дослідником.

Отримані результати забезпечують вирішення актуальних наукових завдань у галузі знань 09 – “Біологія”.

У підсумку, дисертація Синюгіної Агнеси Тарасівни *“Внутрішньоклітинні барвники як зонди для флуоресцентної візуалізації клітин і потенційні реагенти для фотодинамічної терапії”* відповідає спеціальності 091 – “Біологія” і вимогам “Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у вищих навчальних закладах (наукових установах)”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. №261 (зі змінами й доповненнями від 03 квітня 2019 р. №283) 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 від 12 січня 2022 р. №44, а її автор повністю заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – “Біологія”.

Офіційний рецензент:

завідувач відділу синтетичних біорегуляторів
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України, д.х.н., ст.н.с.



Ігор ДУБЕЙ

