

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Ткачової Тетяни Миколаївни «Механізми взаємодії комплексів на основі неорганічних наночастинок і органічних молекул з модельними мембранами та живими клітинами»**, яка подана на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Дисертаційна робота Т.М. Ткачової присвячена актуальній проблемі сучасної біофізики щодо встановлення фізичних механізмів процесів взаємодії біологічно сумісних неорганічних наночастинок, що можуть використовуватися в якості носіїв органічних молекул та ліків, з модельними та реальними мембранними структурами. **Актуальність** обраної теми пов'язана з перспективністю застосування новітніх наноматеріалів та доробку нанотехнологій у сучасній медицині для ефективної діагностики та лікування. Зокрема, розробка фармакологічних препаратів з бажаними фармакокінетичними і терапевтичними властивостями на основі комплексів молекул лікарських речовин та наночастинок є обнадійливим напрямком у вирішенні проблем керованого транспорту ліків до біологічних мішеней, та питань, пов'язаних з високою токсичністю деяких лікарських засобів, їх поганою розчинністю в біологічних рідинах, неспецифічною акумуляцією в організмі, тощо.

В даній роботі увага зосереджена на неорганічних нанокристалах діоксиду церію та ортованадатів рідкісноземельних елементів, які в останні роки привертають увагу дослідників як потенційні наноносії для ліків завдяки їх біологічній сумісності. Тому розробка новітніх лікарських форм із використанням саме цих нанокристалів є перспективною з точки зору **практичного застосування** у медичній практиці та розробки нових наноматеріалів із заданими властивостями. Слід зазначити, що дисертаційна робота виконувалась відповідно до затверджених планів науково-дослідних робіт Інституту сцинтиляційних матеріалів НТК «Інститут монокристалів» НАН України в рамках чотирьох держбюджетних тем.

Отже, **обрана тема дисертації та поставлені в роботі наукові завдання** щодо встановлення фізичних механізмів утворення комплексів наноносій/діюча речовина, визначення термодинамічних параметрів взаємодії ряду органічних барвників із неорганічними наночастинками та особливостей вилучення органічних речовин з вказаних комплексів при їх взаємодії з мембранними структурами є **безумовно актуальними**.

**Обґрунтованість наукових висновків дисертації та їх достовірність** не викликають сумнівів завдяки використанню в роботі надійних та добре розвинутих спектроскопічних методів дослідження, глибокому аналізу результатів експериментів, а також кореляції ряду результатів із вже відомими літературними даними. Безумовною позитивною ознакою роботи є те, що висновки роботи та запропоновані моделі взаємодії досліджених органічних барвників з наночастинками базуються саме на експериментальних даних, причому спектр застосованих в дослідженні фізичних методів є вельми широкий. Експериментальні виміри зроблено з використанням сучасних приладів, наявних в Інституті сцинтиляційних матеріалів, та з застосуванням оригінальних методик приготування систем для дослідження та обробки отриманих спектральних даних.

**Наукова новизна роботи** полягає у тому, що основні результати дисертації отримано вперше.

Найцікавішими, на мій погляд, є такі **нові результати**:

1. За допомогою спектроскопічних методів детально вивчено та доведено здатність неорганічних наночастинок на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів  $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  ( $\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$ ), стабілізованих цитрат-аніонами, до сорбції поліметинових катіонних барвників та утворення стабільних комплексів наночастинка/органічний барвник. Запропоновано модель взаємодії в таких комплексах.

2. В експериментах *in vitro* показано, що неорганічні наноносії (на основі сферичних наночастинок  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  та  $\text{CeO}_2$ ) здатні забезпечити більш швидке вилучення ліпофільних органічних молекул барвників  $\text{DiOC}_{18}$ ,  $\text{DiIC}_{18}$  при взаємодії з мембранними структурами в порівнянні з органічними наноносіями (ліпосомами фосфатиділхоліну). Отримано кінетичні параметри процесу вивільнення органічних молекул з комплексів наночастинка/органічний барвник.

3. Експериментально доведено, що процес акумуляції комплексів неорганічна наночастинка/органічний барвник в клітинах гепатоцитів щурів та вивільнення ліпофільних органічних молекул з комплексів може бути контрольованим за допомогою внесення в досліджувані системи інших ліпофільних речовин, зокрема холестерину.

4. Вперше запропоновано використання саме неорганічних наночастинок на основі  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  та  $\text{CeO}_2$  в якості нанорозмірних носіїв для транспортування органічних молекул в певні структури живих клітин, базуючись на даних мікроскопічних досліджень щодо акумуляції комплексів на основі сферичних наночастинок  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  та барвника JC-1 в ядрах гепатоцитів щурів.

Представлена дисертаційна робота справляє досить приємне враження. Рукопис складає 146 сторінок, на яких крім тексту розміщено 49 рисунків і список використаних літературних джерел, що складається з 201 найменування.

У відповідності до вимог у **складі дисертації є вступ, п'ять розділів** (один з яких є оглядовим, другий методичним, інші містять оригінальні результати), а також **висновки**. Розділи добре структуровані, у завершенні кожного розділу містяться висновки. Матеріали дисертації викладено ясно, послідовно, лаконічно, у відповідності до існуючих стандартів для наукової мови. Робота добре проілюстрована, більшість рисунків виконано якісно, дані розрахунків наведено в таблицях, що покращує сприйняття отриманих результатів.

У **вступі** дисертаційної роботи Т.М. Ткачової критично проаналізовано сучасний стан використання доробку нанотехнологій, зокрема різних типів наночастинок, в біології та медицині для діагностики та лікування захворювань, та наголошено на тих проблемах, які існують в цій галузі. В цьому розділі також сформульовано мету та наукові завдання дисертаційної роботи, коротко викладено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів.

Для вирішення поставлених в роботі завдань було використано ряд сучасних фізичних методів, зокрема спектрофотометрію, флуоресцентну спектроскопію та спектроскопію збудження флуоресценції, флуоресцентну мікроскопію та мікроспектроскопію, просвічуючу електронну мікроскопію, метод фазового аналізу світлорозсіювання, опису яких присвячено **другий розділ** роботи.

Оцінюючи оригінальні розділи, треба відзначити, що експерименти в роботі були добре сплановані та проведені системно. Оскільки основним завданням дисертаційної роботи є встановлення механізмів взаємодії комплексів на основі неорганічних наночастинок і органічних молекул з модельними мембранами та живими клітинами, відправною точкою таких досліджень є інформація про

механізми взаємодії самих неорганічних наночастинок з різними типами органічних барвників (гідрофільними та гідрофобними), чому присвячено **третій розділ** роботи. В цьому розділі спектроскопічними методами доведено формування нековалентних комплексів між наночастинами на основі  $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  та катіонними поліметиновими барвниками, запропоновано модель взаємодії в таких комплексах.

**Четвертий розділ** описує дослідження кінетичної та термодинамічної стабільності комплексів органічних і неорганічних наноконтейнерів з гідрофобними барвниками  $\text{DiOC}_{18}$  та  $\text{DiIC}_{18}$  (що складають пару донор-акцептор для безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження, FRET-пару) за допомогою методу ратіометричної детекції флуоресценції. Окрему увагу у цьому розділі приділено порівняльному дослідженню стабільності комплексів на основі неорганічних наночастинок та комплексів, що базуються на добре відомих органічних наноносіях – міцелах та ліпосомах. Порівняльний аналіз кінетичних та термодинамічних параметрів дозволив зробити висновок про досить високу стабільність комплексів на основі  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  в умовах кімнатних та близьких до фізіологічних температур, що робить їх перспективними для практичного використання.

**В п'ятому розділі** використано ратіометричні підходи для вивчення взаємодії комплексів наноконтейнер/ліпофільний барвник із модельними мембранами та живими клітинами за допомогою спектроскопії та мікроспектроскопії. Показано, що комплекси на основі неорганічних наночастинок дуже ефективно накопичуються клітинами гепатоцитів щурів. Отримані дані дозволили розрахувати константи швидкості вилучення та часи напіввиведення молекул гідрофобних барвників  $\text{DiOC}_{18}$  та  $\text{DiIC}_{18}$  із комплексів з наноносіями різних типів при їх взаємодії з модельними системами мембран клітин та живими клітинами в експериментах *in vitro*. Крім того, отримані експериментальні дані свідчать про те, що процес взаємодії наноконтейнерів з клітинними мембранами може корегуватися за допомогою включення в систему ліпофільних компонентів (зокрема холестерину), а неорганічні наночастинок на основі  $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  та  $\text{CeO}_2$  можуть бути використані як наноплатформи для внутрішньоклітинної доставки гідрофобних компонентів, зокрема в ядра гепатоцитів.

У цілому, дисертація виконана на високому науковому рівні і свідчить про високу фахову та кваліфікаційну підготовку здобувача.

Водночас дисертаційна робота не позбавлена певних **недоліків**.

1. При формулюванні наукової новизни отриманих результатів (пункт 1, стор.10 дисертаційної роботи, та стор. 3 автореферату) та висновку 1 до розділу 3 дисертації (стор.90) не вказано, що у розчині неорганічні частинки на основі  $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  ( $\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$ ) були стабілізовані цитрат-аніонами, що є, на мій погляд, важливим для розуміння можливості електростатичної взаємодії наночастинок з катіонними барвниками, про що йдеться в цих пунктах, та на чому базується запропонована в дисертації модель взаємодії наночастинка/катіонний барвник (розділ 3, стор.64, рис.3.3). У зв'язку з цим хочу висловити рекомендацію щодо подальшого розвитку запропонованої моделі адсорбції барвників на наночастинок ортованадатів, стабілізованих цитрат-аніонами. Зокрема, було б доцільно врахувати в моделі конкуренцію між катіонами барвників та наявними в досліджуваних системах катіонами натрію (протионами цитрат-аніонів) за зв'язування з наночастинками.

2. Одним з недоліків роботи вважаю певні спрощуючі припущення при розгляді процесів у досліджуваних системах при оцінюванні кінетичної та

термодинамічної стабільності комплексів наноконтейнер/барвник по динаміці перерозподілу гідрофобних барвників DiO/DiI між наноносіями методом ратіометричної детекції (FRET) (розділ 4, стор. 95-105). В роботі, зокрема, вивчались комплекси наноконтейнерів (НК) з барвниками, НК/DiOC<sub>18</sub> та НК/DiIC<sub>18</sub> (гомокомплекси), які в експериментальних системах при змішуванні можуть утворювати гетерокомплекси НК/(DiOC<sub>18</sub><sup>+</sup> DiIC<sub>18</sub>) (стор. 95). Як впливає з опису схеми проведених експериментів (стор. 93-95) по наявності FRET-сигналу детектували саме утворення гетерокомплексів НК/(DiOC<sub>18</sub><sup>+</sup> DiIC<sub>18</sub>), де молекули донора та акцептора FRET-пари зближуються на відстань ферстеровського радіусу і відбувається явище безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження. При аналізі даних цих експериментів авторкою припущено, що процеси утворення гетерокомплексів (перерозподіл барвників донорів та акцепторів між наночастинками) та розпаду гомокомплексів можуть бути описані одними і тими самими кінетичними та термодинамічними параметрами. Наприклад, коефіцієнт  $K(\text{год}^{-1})$  у кінетичному рівнянні (4.1) (стор. 97) дисертації та в рівнянні (1) автореферату (стор.11-12) названо «константа швидкості розпаду комплексів складу НК/DiOC<sub>18</sub> та НК/DiIC<sub>18</sub> і утворення комплексів складу НК/(DiOC<sub>18</sub><sup>+</sup> DiIC<sub>18</sub>); або коефіцієнт перерозподілу барвників між наноконтейнерами». Такий підхід утотожнення процесів розпаду гомокомплексів і утворення гетерокомплексів, на мій погляд, є вельми спрощеним та не враховує весь спектр процесів, що можуть відбуватися в експериментальній системі. Так, розпад гомокомплексів не завжди призводить до утворення гетерокомплексів, а може, наприклад, продовжуватися процесами зв'язування вивільнених гідрофобних молекул барвників між собою (утворення комплексів барвників без НК), або приєднання вивільненого барвника до комплексу, що несе такий самий барвник (утворення гомокомплексів іншого стехіометричного складу). Крім того, як зазначено в роботі Owen S.C. та співавторів «Polymeric Micelle Stability», на яку посиляється авторка дисертації (посилання 181 дисертації), обмін молекулами між міцелярними наноконтейнерами може відбуватися не тільки при розпаді комплексів НК/інтегрована молекула, а й при злитті та укрупненні міцелярних наноносіїв, або при з'єднанні наноносіїв за допомогою інтегрованої молекули.

3. Дискусійним, на мій погляд, є також припущення, що початкова концентрація комплексу НК/DiOC<sub>18</sub> в рівняннях 4.5 та 4.6 дорівнює початковій концентрації самого барвника DiOC<sub>18</sub> (стор. 100 дисертації).

4. Невелике зауваження є щодо вибору температур при оцінюванні температурного впливу на кінетичну та термодинамічну стабільність комплексів НК/барвник (розділ 4, табл. 4.1, стор. 98, та табл. 4.2, стор.102). Так, для проведення експериментальних вимірів було обрано температури, починаючи з кімнатної (+20°C), наступні точки оцінювання - +30°C, +40°C та вищі температури. На мій погляд, було б доречно також експериментально оцінити стабільність комплексів саме за фізіологічної температури (37°C), про яку згадується у висновку 3 дисертаційної роботи, хоча оцінки стабільності безпосередньо за фізіологічної температури не наведено в таблицях дисертації та автореферату.

5. Серед недоліків роботи слід також вказати, що показник кінетичної стабільності комплексів  $\tau_{1/2}$  в розділі 4 дисертаційної роботи названо «часом життя комплексів» (стор.97 та висновок 3 на стор.105 дисертації, стор.12 автореферату), а вже в розділі 5 (стор. 111 та висновок 3 на стор.122 дисертації) цей самий показник названо «часом напіввиведення». Це вносить додаткове непорозуміння ще й тому.

що ці дві назви одного параметру зустрічаються в пунктах 3 та 5 Висновків до всієї дисертаційної роботи (стор. 124-125 дисертації, та стор.16 автореферату).

У дисертації присутня також незначна кількість технічних (стилістичних та граматичних) недоліків, наприклад:

- Рисунок 2.6. другого розділу (стор. 46), що містить структурні формули молекул барвників та молекул, з яких побудовані міцели та ліпосоми, не має нумерації (або маркування літерою) кожної з молекул, тому позначені у підпису до рисунку назви (та хімічні формули) речовин важко співвіднести з наведеними на рисунку структурними формулами.
- Наявні неузгодження та помилки у реченнях, розташованих на 22-24 рядках стор. 17, на 18-21 рядках стор. 35, на 7 рядку стор. 38.
- У 26 рядку на стор. 32 замість терміну «кулоновы контакты» доцільно було б використати загальноновживаний термін «кулоновские взаимодействия».
- У 20 рядку на стор. 33 замість словосполучення «маршрут захвата молекул клетками» доречно було б говорити про «спосіб захвата молекул клетками», та ін.

Наведені зауваження не впливають на достовірність наукових висновків та не знижують високої оцінки роботи в цілому.

Аналіз роботи та опублікованих здобувачкою та співавторами наукових праць показує, що дисертаційна робота є **завершеним науковим дослідженням**, в якому успішно виконано поставлені завдання та отримано нові достовірні експериментальні результати, що в сукупності **вносять вагомий вклад** у розвиток галузі молекулярної біофізики, що пов'язана з вивченням міжмолекулярних взаємодій біологічно активних речовин, зокрема нанокристалів, та біологічних структур.

**Наукова значущість** представленої дисертації полягає в тому, що в ній отримано нові науково обґрунтовані положення в галузі біофізики щодо характеру взаємодії органічних та неорганічних наноконтейнерів з модельними мембранами та живими клітинами в експериментах *in vitro*.

**Практична значущість** роботи визначається тим, що результати дослідження вказують на можливість використання неорганічних наночастинок ортованадатів  $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  та діоксиду церію  $\text{CeO}_2$  у якості носіїв ліпофільних органічних молекул, що є перспективним для розробки новітніх лікарських форм з використанням неорганічних наноносіїв. Отримані дані можуть бути використані для пошуку та розробки нових біологічно сумісних нанокристалів у якості наноносіїв.

Основні результати дисертації **повністю викладено** у 7 наукових статтях в міжнародних та вітчизняних фахових журналах та у 8 тезах доповідей. Робота пройшла ретельну **апробацію** на фахових національних та міжнародних наукових конференціях.

Тема та зміст дисертації **відповідають спеціальності 03.00.02 – біофізика**.

**Автореферат** вірно відображає зміст дисертації.

За обсягом проведених досліджень, високим науковим рівнем, новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертаційна робота «Механізми взаємодії комплексів на основі неорганічних наночастинок і органічних молекул з модельними мембранами та живими клітинами» 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 її авторка Ткачова Тетяна Миколаївна **заслуговує**

присудження їй наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент,  
старший науковий співробітник  
відділу молекулярної біофізики  
Фізико-технічного інституту низьких температур  
ім. Б.І. Веркіна НАН України,  
с.н.с., кандидат фізико-математичних наук

*Пашинська В.А.* – Пашинська В.А.

18 листопада 2015 р.

Особистий підпис Пашинської В.А.

ЗАСВІДЧУЮ

Учений секретар Фізико-технічного інституту  
низьких температур ім. Б.І. Веркіна  
Національної академії наук України  
кандидат фізико-математичних наук



Калиненко О.М