

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

ГНАТЮК Олени Петрівни

«Спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами», поданої на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

У дисертаційній роботі Гнатюк О.П. сучасними спектроскопічними методами досліджуються молекулярні механізми взаємодії біологічних макромолекул (зокрема, білків та фосфоліпідів) з лікарськими препаратами та наноструктурами різної природи. Такі ґрунтовні фундаментальні дослідження необхідні для вирішення багатьох прикладних біології та медицини, таких як модифікація наноструктур за допомогою біомолекул, розробка та характеристика нових гібридних матеріалів з заданими властивостями тощо. Адже сьогодні питання можливостей клінічних застосувань наночастинок та створення на їх основі систем таргетної доставки ліків до фармакологічної мішені є одним з найбільш актуальних у сучасній медицині та фармакології. Свідченням високої актуальності обраної теми дослідження є вагомий перелік українських та міжнародних наукових проєктів, у яких дисертантка брала участь як відповідальний виконавець. Частина представлених в роботі даних стала результатом співпраці з литовськими (Центр фізичних досліджень та технологій, Вільнюс), польськими (Інститут низьких температур та структурних досліджень ПАН, Вроцлав), та американськими (Медична Школа Х'юстона) колегами.

Хочу особливо відмітити представлені в дисертаційній роботі Гнатюк О.П. результати експериментальних досліджень методом когерентного антистоксового раманівського розсіяння (CARS). Ця методика, на жаль, дуже мало znana в Україні з огляду на відсутність необхідного обладнання, а тому і відсутність фахівців у цій сфері. Проте, дослідження методами нелінійної оптики (такими як генерація другої гармоніки, CARS) біологічних молекул, клітин та тканин є дуже перспективними, зокрема для задач медичної діагностики онкологічних та інших захворювань, і такі роботи є в сучасній науковій літературі. На відміну від звичайних мікроскопічних досліджень, нелінійні оптичні методи дозволяють більш точно і на ранніх стадіях виявляти патологічні стани, коли ще відсутні будь-які зовнішні прояви патології. Тому безумовно даний напрямок варто розвивати в Україні, і тому наявність таких даних в дисертаційній роботі додає важливості і актуальності.

Цінним доробком дисертації є суттєве розширення можливостей застосування коливальної спектроскопії для прикладних медичних задач, зокрема для конформаційного аналізу колагену, що входить до складу досліджуваних тканин, з метою оцінки ефективності проведеної терапії.

Це задача дуже непроста, оскільки вимагає глибокого знання процесів, методично вивіреного і правильного приготування зразків для реєстрації спектрів, а також детального аналізу спектральної інформації. Однак, отримані результати дозволяють на молекулярному рівні показати, як відновлюється структура пошкодженої тканини з часом, як відбувається деградація імплантованих полімерних плівок, що використовували для терапії, що практично неможливо зробити іншими методами.

Серед найбільш цікавих результатів роботи варто також відмітити оцінку ефективності проведеної терапії шляхом дослідження методом ІЧ спектроскопії вторинної структури колагену у різних тканинах після застосування терапії та визначення структури відновлених тканин.

Дисертаційна робота Гнатюк О.П. складається зі вступу, 5 розділів та висновків.

У вступі обґрунтовано актуальність обраної теми дослідження, викладено мету та основні задачі, визначено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, також наведено інформацію про публікації здобувача та апробацію роботи. Оскільки дисертаційною роботою є сукупність наукових статей, у вступі коротко (але більш широко, ніж у авторефераті) викладено зміст основних розділів.

Перший розділ присвячено дослідженню впливу 2D наночастинок WS_2 та BN на культури клітин, а також на конформаційні властивості лізоциму. Наведені дані про характеризацію наночастинок методом спектроскопії комбінаційного розсіяння, візуалізацію методом TEM та CARS мікроскопії, а також охарактеризовано цитотоксичність водних суспензій наночастинок. Показано, що токсичність WS_2 зростає на другу добу, що може бути пов'язано з процесами окислення. Показано, що збурення клітинної мембрани наночастинок відбувається в першу годину інкубації клітин з наночастинками, про що свідчать зміни в ІЧ-спектрах в області СН валентних коливань та в області фосфатних молекулярних груп. Показано, що наночастинки BN можуть бути використані як поверхні для отримання оптичних сигналів від клітинних органел. Проведено візуалізацію культур клітин методом CARS мікроскопії та показано, що за умови повторного сканування одної і тої ж клітини на зображенні з'являються об'єкти люмінесцентної природи, імовірно пов'язані з цитохромом С. За результатами досліджень методом спектроскопії КР показано, що наночастинки WS_2 можуть проникати в клітину, тобто можуть бути використані для візуалізації культур клітин, а також, що вони можуть мати подвійний вплив на конформаційні властивості лізоциму – або індукувати утворення амілоїдних фібрил, або, навпаки, перешкоджати їх утворенню, в залежності від зовнішніх умов. Цей результат може бути використаний для отримання структур із заданими властивостями.

У другому розділі дослідженого вуглецеві структури з точки зору можливості їх застосування для підсилення оптичних сигналів та візуалізації біологічних молекул. Наведено інформацію щодо візуалізації молекули ДНК на підложці з одношарового графену. Це унікальні

експериментальні дані, які демонструють можливості методу CARS для дослідження біологічних молекул. Визначено спектральні маркери ДНК та проведено їх порівняльний аналіз з даними спектроскопії КР. У **третьому розділі** проведено порівняльний аналіз та узагальнення спектральних маркерів вуглецевих наноструктур, таких як сажа, вуглецеві нанотрубки, графен.

У **четвертому розділі** розглянуто дві моделі ліпідних везикул (ліпосом), які використовуються для таргетної доставки ліків, – з лікарськими препаратами, вбудованими в мембрану, і адсорбованими на мембрані. Для отримання таких систем було розроблено та випробувано два протоколи. Описано спектральні відмінності систем, отриманих таким чином. Ці дані можуть бути використані для моделювання та аналізу взаємодії лікарських засобів з клітинними мембранами. Визначено структурні особливості загальної фракції фосфоліпідів, виділених з пухлинних клітин, та визначено їхні спектральні маркери.

П'ятий розділ містить результати досліджень вторинної структури колагену у складі тканин твердої мозкової оболонки (ТМО) та у складі тканин ахілового сухожилля. Тканини ТМО були досліджені на предмет відновлення структури після модельованої черепно-мозкової травми та із застосуванням полімерних плівок різного складу для відновлення нормальної ТМО. Показано, що плівки на основі колагену найкраще піддаються біодеградації та приводять до повного відновлення ТМО. Біодеградація плівок на основі хітозану відбувається довше, відновлена з їх допомогою тканина ТМО має більш тонку структуру і не повністю сформовані волокна. Дані ІЧ спектроскопії повністю корелюють з даними конфокальної мікроскопії та оптичної мікроскопії.

Поряд з високим рівнем проведених досліджень та цінністю отриманих результатів, слід виловити наступні зауваження:

1. Варто було провести кореляцію між КР та ІЧ спектрами досліджуваних наночастинок, зокрема нанотрубок та графену. Це може мати пряме практичне застосування для контролю технологічного процесу отримання (синтезу) наночастинок, оскільки присутність тих чи інших спектральних маркерів може свідчити про різні дефекти в структурі, наявність функціональних груп на поверхні, кількість шарів тощо.
2. Для більшої наочності та кращого розуміння результатів досліджень як взаємодії біомолекул з наночастинок, так і модельних ліпосом та культур тканин варто було б побудувати різницеві спектри, з яких можна було б чітко побачити, в яких спектральних областях відбуваються найбільші зміни і у чому вони полягають
3. Зважаючи на цінність отриманих результатів, що стосуються протекторних властивостей наночастинок нітриду бору, а також перспективи їх використання для візуалізації клітинних органел, варто продовжити дослідження у цьому напрямку і довести до практичного впровадження.

4. У висновку 11, який стосується аналізу вторинної структури колагену, варто було більш чітко сформулювати спектральні маркери потрійної спіралі, а також визначити спектральні маркери типу колагену, що входить до складу досліджуваної тканини.

Проте, зазначені зауваження є, по суті, побажаннями і ніяким чином не знижують високої оцінки роботи та не зменшують її цінності. Результати, представлені в дисертації, повністю опубліковано у 19 статях у наукових фахових виданнях (з них 11 робіт у виданнях, що входять до перших двох квартилів (Q1/Q2) за класифікацією SCImago Journal and Country Rank), 2 розділах у колективних монографіях, а також представлено на 31 наукових конференціях. Представлені результати є достовірними та новими, а сформульовані у дисертації висновки – науково обґрунтованими. Автореферат повністю передає зміст основних положень дисертації.

На підставі всього вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота «Спектроскопічні маркери взаємодії біологічних макромолекул, клітин та тканин з протипухлинними препаратами та наноструктурами», є завершеною науковою працею, яка повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., а її авторка, Гнатюк Олена Петрівна, заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

провідний науковий співробітник
фізичного факультету
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор фізико-математичних наук,
старший дослідник



ДОРОШЕНКО Ірина Юріївна

Підпис засвідчує
Вчена СЕКРЕТАР НДЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
10.09.2021р.

