

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу М.О. Декалюк «Нові нановуглецеві флуорофори: синтез, оптичні властивості та їх взаємодія з клітинами», яка подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Актуальність теми. У сучасному розвитку науки кількість напрямків застосування нанорозмірних вуглецевих матеріалів у біотехнології стрімко зростає, однак наразі відомі наноматеріали, що широко використовуються, зокрема графен та графіт у різних модифікаціях, потребують достатньо коштовних вихідних матеріалів і тривалого процесу синтезу та можуть проявляти токсичні впливи на живі організми. Зважаючи на таке становище, виникає потреба розробки нових вуглецевих наноматеріалів, які б мали бажані флуоресцентні властивості, синтезувались в один етап та водночас не проявляли цитотоксичних ефектів.

Вуглецеві точки, які нещодавно було відкрито як новий клас вуглецевих наноматеріалів, можуть стати одними із провідних об'єктів, що відповідають поставленим вимогам. Наноструктури цього класу є дуже перспективними завдяки їх простому та «зеленому» синтезу з різних органічних сполук та потенційним можливостям варіації їх структури у широких межах. Однак, при наявності таких значних позитивних факторів, знання відносно їх структури, спектроскопічних властивостей та перспектив біотехнологічного застосування дуже обмежені. Ці питання мають актуальний характер для сучасних наукових напрямків таких, як: клітинна візуалізація, доставка ліків, тощо, та потребують всебічного вивчення для їх максимально ефективного використання.

Дисертаційна робота М.О. Декалюк присвячена саме проблемі оптимізації методів синтезу нового класу вуглецевих наночасток, детальному вивченню їх структурних та оптичних особливостей. Особлива увага приділялася розробці технологій застосування вуглецевих точок у якості флуоресцентних маркерів для візуалізації клітинних ліній *in vitro* за різних фізіологічних станів.

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна
Національної академії наук України

30 ЛИС 2016
Вх. № 60/03-07 *А.С.С.*

Продемонстровано можливості їх застосування у сучасних методах біологічних досліджень, а саме: флуорометрії, протоковій цитометрії та мікроскопії високої роздільної здатності. Істотним свідченням актуальності напрямку дисертаційної роботи є та обставина, що пов'язані з нею дослідження проводилися відповідно до наукових програм Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна та українсько-німецького співробітництва лабораторії нанобіотехнологій.

Наукова новизна результатів роботи полягає в тому, що більшість описаних у дисертаційній роботі результатів отримано вперше. Найцікавішими та найважливішими, на мій погляд, є такі результати:

1. Розроблено технологію синтезу флуоресцентних вуглецевих наночастинок з покращеними фізико-хімічними та оптичними параметрами та продемонстровано можливість їх включення у структури ліпосом;
2. Детально вивчено структурні особливості отриманих частинок та їх вплив на флуоресцентні характеристики;
3. Вперше встановлені флуоресцентні властивості вуглецевих точок на рівні індивідуальних наноструктур, зареєстровані ефекти мерехтіння емісії;
4. Експериментально доведено не токсичність цих наночастинок для живих клітин і здійснено розробку аналітичного методу флуоресцентного виявлення апоптичних клітин із застосуванням протокової цитометрії та флуоресцентної мікроскопії;
5. Розроблено новий метод контрастування клітин в мікроскопії високої роздільної здатності вуглецевими точками завдяки їх унікальним спектроскопічним властивостям.

Структура, обсяг і зміст дисертації. Представлена до захисту дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, ґрунтується на достатній кількості експериментального матеріалу. Дисертаційна робота побудована згідно з нормативними документами відповідно до вимог ДАК України.

Рукопис складає 128 сторінок, містить 46 рисунків та 4 таблиці. Список використаних джерел складається з 154 посилань.

У структурі дисертації є вступ та 4 розділи, а саме: огляд літератури, опис матеріалів та методів, результати власних досліджень та їх обговорення, висновки. Глави детально структуровані, наприкінці кожної з них містяться висновки. Матеріали дисертації викладено ясно, послідовно й лаконічно у відповідності до існуючих стандартів. Наведені ілюстрації в повній мірі відображають зміст текстового матеріалу.

У вступі й огляді літератури автором критично проаналізовано сучасний стан нанорозмірних вуглецевих матеріалів, їх типи, методи синтезу та основні напрямки застосування у біохімії та біотехнології.

Для вирішення поставлених у роботі завдань автор використовувала різні сучасні методики досліджень, зокрема спектрофотометрію, спектрофлуориметрію, епіфлуоресцентну, конфокальну та електронну мікроскопію, гель-фільтрацію та різні підходи комп'ютерної обробки зображень мікроскопії. Опису цих підходів присвячена друга глава дисертації.

Оцінюючи наступні глави дисертаційної роботи, треба відзначити, що експерименти проведено систематично та вичерпно. Оскільки основним напрямком роботи є розробка нового типу наночасток для клітинної візуалізації, автор провела детальне дослідження методів синтезу вуглецевих флуоресцентних наночасток та запропонувала свої нові підходи. Проведено ґрунтовне вивчення особливостей структури індивідуальних наночасток та їх флуоресцентних властивостей. Базуючись на отриманих даних було запропоновано використання синтезованих вуглецевих точок для клітинної візуалізації із застосуванням різних підходів мікроскопії та методів підготовки зразків.

Четвертий розділ представляє узагальнення отриманих результатів та їх детальне обговорення.

У цілому дисертація виконана на високому науковому рівні й свідчить про високу фахову та кваліфікаційну підготовку здобувача. В той же час, у процесі ознайомлення з матеріалами дисертації виникло ряд зауважень та запитань до дисертанта:

1. У роботі не наведено даних відносно стабільності наночастинок у розчині протягом довгого часу. Чи не мають вони схильності до агрегації? Якими мають бути умови їх зберігання?
2. Для встановлення структурних особливостей наночастинок методом електронної мікроскопії Ви використовували вуглецево-мідну решітку, на яку наносився зразок. Скажіть, чи не впливала наявність міді на результати дослідження?
3. Доцільно було б провести порівняльні експерименти відносно проникнення вуглецевих наночастинок у нативному стані та у складі ліпосоми в середину клітин.
4. Хотілось би наголосити на необхідності патентування розроблених методів синтезу наночастинок та їх застосування для клітинної візуалізації. Рекомендую розглянути цю можливість, оскільки отримані результати є дійсно унікальними та мають перспективу подальшого розвитку.
5. Природньо, що в тексті дисертації трапляються й друкарські помилки, невдалі вислови, які я відмітив, але зупинятися на них не буду.

Ці зауваження не є принциповими, жодним чином не впливають на достовірність наукових положень та висновків. Загальний рівень наведених у роботі результатів є, безумовно, високим та інформативним.

Наукова значимість представленої дисертаційної роботи полягає в отриманні фундаментальних знань відносно нещодавно відкритого класу вуглецевих наноматеріалів. Отримані результати, вирішують конкретне наукове завдання та окреслюють напрямки потенційного застосування цих наночастинок у нанобіотехнології.

Практична значимість визначається тим, що результати роботи вказують на можливість використання вуглецевих флуоресцентних наночасток як клітинних маркерів у низці методів біологічних досліджень. Крім того, автором запропоновано практичний метод виявлення апоптичних клітин за флуоресценцією.

Матеріали дисертації повністю викладено у 6 наукових працях в авторитетних міжнародних виданнях та представлено у якості доповідей на 11 міжнародних конференціях. Основні положення дисертації ідентично відповідають змісту автореферату.

Висновок: вважаю, що за обсягом проведених досліджень, їх високим науковим рівнем, новизною та практичною цінністю отриманих результатів дисертаційна робота «Нові нановуглецеві флуорофори: синтез, оптичні властивості та їх взаємодія з клітинами» є завершеною працею і повністю відповідає всім вимогам п.12 «Положення про присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань» та вимогам ВАК України, які висуваються до кандидатських дисертацій, а автор роботи Декалюк Марія Олегівна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Офіційний опонент,
Завідувач відділу проблем інтерферону
та імуномодуляторів Інституту мікробіології
і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
член-кореспондент НАН України
доктор біологічних наук, професор

М.Я. Співак М.Я. Співак

Підпис *Співака М.Я.*
посвідчується
Зав. канцелярії
Л.В. Макарець

