

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ронишенко Богдана Вячеславовича
«Синтез конъюгатов белков и нуклеиновых кислот с неорганическими наноматериалами: квантовыми точками, окисленным графеном и наночастицами серебра», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности
02.00.10 – биоорганическая химия

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки.

Диссертационная работа Ронишенко Богдана Вячеславовича представляет собой законченное исследование, посвященное разработке новых эффективных методов синтеза конъюгатов неорганических наноматериалов с биологическими молекулами – белками и нуклеиновыми кислотами. По предмету исследования, кругу решаемых научных задач, применяемым методическим подходам диссертация Ронишенко Б.В. полностью соответствует специальности 02.00.10 – биоорганическая химия и отрасли «химические науки».

Актуальность темы диссертации.

Нанотехнологии и нанонауки (нанобиология, наномедицина) – это новые виды дисциплин, которые превращают классические дисциплины, например, химию, биологию, физику и программирование (молекулярное моделирование) в новые подходы для создания средств и лекарств инновационной наномедицины. Применение инновационных подходов для доставки лекарств создает неограниченные возможности для развития совершенно новых видов лекарственных средств и диагностических систем. Иногда трудно назвать их как «лекарство», когда человеческие органы (ухо, хрусталик, кости и др.) печатаются с использованием системы 3D-bioprinting и могут быть использованы для замены поврежденного органа. Потенциал инновационной наномедицины неограничен: в принципе, возможна замена любого органа тела человека, кроме человеческого мозга. Это является конечной целью в этой области науки. Тем не менее, мы все еще в начале нанобудущего. Поэтому, очень важно понять основные принципы взаимодействия между наносистемами и основными биологическими системами с целью разработки химерных структур на основе биосистем и нанотехнологий. В этой связи особое место занимают биоконъюгаты на основе неорганических

наноматериалов. Это связано с уникальными физико-химическими свойствами неорганических наноматериалов, которые в сочетании с биоспецифичностью биомолекул позволяют получать особо ценные для практических приложений материалы. Разработка методов синтеза биоконъюгатов с неорганическими наноматериалами является ключевым этапом их практического применения и коммерциализации. Поэтому такого рода исследования вызывают интерес все большего числа как научных институтов, так и коммерческих организаций.

В этой связи решение научных задач, поставленных в диссертационной работе Ронишенко Б.В., посвященной разработке новых эффективных методов синтеза конъюгатов неорганических наноматериалов с биологическими молекулами, является весьма актуальным и имеет высокую научную и практическую значимость.

Тема и содержание диссертации и автореферата Ронишенко Б.В. соответствуют приоритетному направлению «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства» из перечня приоритетных направлений научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021-2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 №156).

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту.

Результаты, полученные в диссертации и выносимые на защиту, являются новыми.

Автором впервые исследовано влияние фактора электростатического отталкивания на процесс конъюгации полупроводниковых квантовых точек, модифицированных азидными группами, с молекулами красителя и олигонуклеотидным дуплексом, содержащим циклоактиновую функцию.

Впервые получены конъюгаты квантовых точек с красителем JOE с переносом энергии с разным числом молекул красителя, приходящихся на одну квантовую точку. В качестве реагента для восстановления азидных групп наноструктур в водной среде предложен трис(карбоксиэтил)фосфин.

Автором разработан оригинальный метод функционализации поверхности стекла полиэтиленгликолем.

Впервые предложен метод определения поверхностной плотности функциональных групп и определено количество эпоксидных групп в структуре окисленного графена.

Предложен новый метод визуализации наночастиц графена на изображениях растровой электронной микроскопии путем адсорбционной иммобилизации наночастиц серебра.

Установлено, что величина сигнала гигантского комбинированного рассеяния подложек на основе наночастиц серебра определяется электростатическим взаимодействием с аналитом.

Научная и практическая значимость результатов диссертации.

Результаты рецензируемой работы имеют несомненную как научную, так и практическую значимость.

Научная значимость полученных в работе результатов заключается в создании конъюгатов квантовых точек с красителем JOE с переносом энергии с разным числом молекул красителя, приходящихся на одну квантовую точку и разработке нового метода визуализации наночастиц графена на изображениях растровой электронной микроскопии путем адсорбционной иммобилизации наночастиц серебра.

В результате выполненной диссертационной работы получены результаты, имеющие несомненное практическое значение: предложены новые методы функционализации поверхности стекла полиэтиленгликолем, определения поверхностной плотности функциональных групп в структуре окисленного графена, визуализации наночастиц графена на изображениях растровой электронной микроскопии путем адсорбционной иммобилизации наночастиц серебра. Полученные методы имеют практическое значение для разработки новых наноконъюгатов для медицины.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Достоверность полученных результатов, обоснованность научных положений и выводов диссертации обеспечена использованием современных методов химического синтеза и анализа состояния конъюгатов, включая современные методы физического анализа объектов (комбинационное рассеяние, дзета-потенциал, гидродинамический диаметр, спектры поглощения и др.). Сделанные выводы вытекают из основного содержания диссертации, аргументированы и соответствуют цели и задачам работы.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати.

Основные научные результаты и положения диссертации достаточно полно представлены и обсуждены в научной печати. Материалы диссертации

нашли отражение в 7 статьях в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК Республики Беларусь, а также в 7 тезисах докладов на 4 международных научных конференциях. Общий объем публикаций составляет 4,2 авторских листа.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Беларуси. Работа изложена на 123 страницах машинописного текста, содержит 45 рисунков и 8 таблиц. Работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, методической части, результатов собственных исследований, заключения, списка использованных источников, включающего 155 библиографических наименований. По материалам диссертации получены 3 акта о возможности практического применения и 2 акта внедрения в учебный процесс.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени кандидата химических наук.

Диссертационная работа Ронишенко Б.В. представляет собой законченное экспериментальное исследование, выполненное с использованием широкого спектра современных химических, физико-химических и аналитических методов, что свидетельствует о высокой научной квалификации соискателя ученой степени. На основании анализа полученных результатов и их обсуждения, содержания опубликованных работ и автореферата диссертации считаю, что научная квалификация Ронишенко Б.В. полностью соответствует ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Выполнение требований пунктов 24-26 Положения о защите диссертаций.

В диссертации соискатель ученой степени приводит ссылки с указанием авторов и источников, материалы которых он использует. Ссылки приводятся также и на собственные публикации, в которых содержатся материалы, излагаемые в диссертации.

При использовании в диссертации результатов, принадлежащих лицам, совместно с которыми были написаны научные работы, а также иным лицам, автор ссылается на них и отмечает это в диссертации и автореферате ссылкой на источник.

Проверка текста с помощью Advego Plagiat 3.0.19 показала, что оригинальность текста по фразам составляет 93%, по словам 62%. В целом, оригинальность текста высокая.

Используемая программа не обнаружила нелегитимных заимствований научных работ других авторов. На все найденные источники по тексту диссертации расставлены ссылки.

Представленный в диссертации обзор литературы (первая глава) дает достаточно четкое представление о биоконъюгатах на основе неорганических наноматериалов и полупроводниковых квантовых точек, биоконъюгатах на основе окисленного графена. Далее автор акцентирует внимание на их практическом применении. Особое внимание автором уделено методам очистки и функционализации наноматериалов.

Вторая глава (результаты и обсуждение) посвящена синтезу и функционализации поверхности квантовых точек, исследованию тушения люминесценции квантовых точек JOE в конъюгате, конъюгации квантовых точек с олигонуклеотидным дуплексом и бычьим сывороточным альбумином, очистке и выделению биоконъюгатов с квантовыми точками. Далее автором рассмотрены вопросы синтеза и характеристика окисленного графена, его иммобилизации и функционализации на стекле, конъюгации с красителем, очистке и выделению биоконъюгатов окисленного графена. Следующим важным шагом является представление результатов анализа биоконъюгации наночастиц серебра, в том числе их синтеза и характеристики, иммобилизации на поверхности, анализу меченого красителем олигонуклеотида с помощью спектроскопии гигантского комбинированного рассеяния. Автором исследован процесс карбодиимидной конденсации квантовых точек с аминами. Разработан метод их контролируемой функционализации азидными группами путем карбодиимидной конденсации, позволяющий регулировать количество функциональных групп на поверхности квантовых точек, варьировать их дзета-потенциал, а также вводить комбинации функциональных групп за счет использования соответствующих аминов. Изучено влияние электростатического отталкивания на скорость сопряжения отрицательно заряженных квантовых точек с модельным красителем JOE. Разработана методика очистки конъюгатов квантовых точек от биомолекул (белков и нуклеиновых кислот) методом гель-хроматографии. Получены биоконъюгаты квантовых точек с флуоресцентно меченым белком БСА и олигонуклеотидным дуплексом. Показана ключевая роль фактора электростатического взаимодействия в конъюгации квантовых точек с

олигонуклеотидами. Предложен новый метод количественного анализа функциональных групп в структуре окисленного графена методом адсорбционной иммобилизации на стекле. Такой подход позволил не только исследовать процесс функционализации окисленного графена, иммобилизованного на поверхности стекла, но и анализировать уже функционализированный коллоидный окисленный графен с минимальным количеством необходимого наноматериала. Разработан метод приготовления наноструктурированных активных в отношении гигантского комбинационного рассеяния подложек на основе наночастиц серебра, основанный на адсорбционной иммобилизации наночастиц серебра на стекле. Высокая однородность сигнала таких подложек и неполное заполнение поверхности наночастиц позволили использовать их в качестве удобной модельной системы для изучения роли электростатического взаимодействия поверхности серебра с молекулами аналита.

В главе 3 (материалы и методы) приведены методы химического синтеза и анализа состояния конъюгатов, включая современные методы физического анализа объектов – комбинационное рассеяние света, дзета-потенциал, гидродинамический диаметр, спектры поглощения и др.

В заключении автор подытоживает полученные данные и делает соответствующие логические выводы. Полученные данные прекрасно обсуждены с привлечением 155 отечественных и зарубежных источников, а также 14 работ автора.

В целом, работа очень хорошо оформлена, написана четким и ясным языком, не содержит опечаток. Изложение экспериментальных результатов выстроено в логической последовательности, все обсуждаемые положения и выводы хорошо проиллюстрированы 45 рисунками и 8 таблицами. Автореферат диссертации отражает суть работы, ее результаты и основные положения, которые автор выносит на защиту.

Однако, при анализе результатов у меня возникли следующие вопросы:

К сожалению, в главе 3 не приведен раздел о методах и способах статистического анализа данных.

В главе второй также не указаны способы статистического анализа данных, а именно: не указаны разбросы данных дзета-потенциала исследованных наночастиц (стр. 38, 39, Таб. 2.1, 2.2 и далее по всему тексту).

Какова точность данных при анализе азидных групп (Таб. 2.1)?

Насколько варьировали размеры квантовых точек?

Из рисунка 2.7. можно определить константы тушения и число молекул JOE, приходящихся на одну квантовую точку.

Какое молекулярное соотношение олигонуклеотида и белка к квантовым точкам было при биоконъюгации? Можно ли было его определить методами гель-фильтрации?

Почему не сделана электронная микроскопия квантовых точек (см. СЭМ графена и наночастиц серебра)?

В эксперименте с биоконъюгацией окисленного графена с красителем (рис. 2.30, 2.31) было бы интересно сделать эксперимент при разных температурах. Это более точно позволило бы выяснить процесс ковалентной конъюгации.

Рис. 2.36 – не указана шкала для АСМ.

Хотелось бы точнее узнать степень очистки наноматериалов хотя бы в % (см. Таб. 2.3, таб. 2.7).

Есть ли данные по степени очистки наночастиц серебра от биомолекул (порфирина)?

Очень много сокращений. Часто, для ясности, более удобно писать целые слова.

Высказанные вопросы, однако, не влияют на сделанные автором выводы и положения, выносимые на защиту, и могут быть сняты в процессе дискуссии.

Заключение.

Считаю, что диссертация Ронишенко Богдана Вячеславовича на соискание ученой степени кандидата химических наук на тему: «Синтез конъюгатов белков и нуклеиновых кислот с неорганическими наноматериалами: квантовыми точками, окисленным графеном и наночастицами серебра», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, является законченным научным трудом и по актуальности темы, объему и значимости полученных результатов отвечает требованиям ВАК Беларуси, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

В соответствии с требованиями п.20 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, Ронишенко Богдан Вячеславович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия за новые научно обоснованные результаты, включающие:

- обнаружение влияния фактора электростатического отталкивания на процесс конъюгации полупроводниковых квантовых точек, модифицированных азидными группами, с молекулами красителя и олигонуклеотидным дуплексом, содержащим циклоактиновую функцию,

- получение конъюгатов квантовых точек с красителем JOE с переносом энергии с разным числом молекул красителя, приходящихся на одну квантовую точку,

- разработку оригинального метода функционализации поверхности стекла полиэтиленгликолем,

- разработку метода определения поверхностной плотности функциональных групп в структуре окисленного графена и определение количества эпоксидных групп в его структуре,

- разработку метода визуализации наночастиц графена на изображениях растровой электронной микроскопии путем адсорбционной иммобилизации наночастиц серебра,

- установление того факта, что величина сигнала гигантского комбинированного рассеяния подложек на основе наночастиц серебра определяется электростатическим взаимодействием с аналитом.

Результаты работы внедрены в учебный процесс Гомельского государственного медицинского университета.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией нанобиотехнологий

ГНУ «Институт биофизики

и клеточной инженерии НАН Беларуси»,

доктор биологических наук, доцент

Д.Г. Щербин

