

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Яковів Марії Василівни «Амфіфільні флуоресцеїнвмісні кополіестери N-похідних глутамінової кислоти, одержані за реакцією Стегліха», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.06 – хімія високомолекулярних сполук

Актуальність теми

Перспективним напрямом розвитку хімії високомолекулярних сполук є створення біосумісних амфіфільних полімерів медико-біологічного призначення як основи для систем доставки ліків з одночасною можливістю діагностики і терапії. В межах цього напрямку виконана дисертація Марії Яковів, присвячена дуже важливій і актуальній темі, а саме, встановленню умов одержання і синтезу на цій основі флуоресцеїнсмісних амфіфільних поліестерів, які містять у своєму складі хромофорну групу, що дає можливість контролювати рух частинок у біологічних середовищах за спектральним відгуком. Одночасно вирішується задача надання таким маркерам високої поверхневої активності та потрібних колоїдно-хімічних властивостей, що забезпечило би можливість використовувати синтезовані наночастинки для транспортування ліків або проводити моніторинг їх руху у медико-біологічних системах, встановлювати зони накопичення наночастинок, наповнених лікарськими препаратами.

Важливість тематики дисертаційної роботи Марії Яковів підтверджена включенням її до державних науково-технічних програм шляхом виконання низки держбюджетних тем: «Конструювання тераностиків на основі макромолекул псевдополіамінокислот для моніторингу доставки та вивільнення терапевтичних препаратів» (2013-2014) держ. реєстр. № 0113U003183; «Конструювання нано- і мікрочастинок ад'ювантів на основі блок-кополімерів природних амінокислот та поліетердіолів для створення вакцин» (2015-2017) № держреєстрації 0115U000442; "Функціональна мімікрія людської шкіри прищепленими до полімерної поверхні гібридними гідрогелями біополімерів для лікування її ушкоджень великої площі" (2018-2019) № держреєстрації 0118U000262, в яких автор дисертаційної роботи була одним з виконавців та участю у міжнародній співпраці, зокрема, стажування у Інституті Молекул і Матеріалів в м. Ле Ман (Франція), Гданському технологічному університеті.

Для проникнення у сутність процесів синтезу амфіфільних поліестерів та розуміння їх хімічної та фізико-хімічної суті необхідно було вирішити ряд наукових завдань, що і зумовило мету роботи - з'ясувати основні закономірності синтезу нових амфіфільних кополіестерів N-похідних глутамінової кислоти з поліетердіолами і флуоресцеїном за реакцією Стегліха та комплекс необхідних їх фізико-хімічних властивостей і продемонструвати шляхи практичного використання.

Застосовуючи комплекс синтетичних, аналітичних та фізико-хімічних методів полімерної хімії, сучасні фізичні методи дослідження, теоретичну обробку результатів з використанням математичних моделей, Марія Яковів провела велику експериментальну роботу, логічно і чітко підпорядковану досягненню поставленої мети. Теоретичне узагальнення отриманих результатів в руслі сучасних теорій і понять хімії ВМС дало їй змогу сформулювати науково обґрунтовані висновки і положення, які і складають наукову цінність дисертації.

Наукова новизна

- виявлено особливості реакції Стегліха при кополіконденсації флуоресцеїну та основні чинники, які мають вплив на її перебіг. На основі розробленого методу шляхом незворотної поліконденсації за реакцією Стегліха вперше синтезовано кополіестер флуоресцеїну та 2-(додеканоїламіно)пентадіоївої кислоти та амфіфільні тер- і тетракополіестери N-ацилпохідних глютамінової кислоти з поліетердіолами ;
- методами ^1H ЯМР спектроскопії, високоефективної SEC хроматографії досліджено особливості структури флуоресцеїнвмісних кополіестерів їх молекулярно-масові розподіли та функціональність в залежності від умов одержання та природи комономерів
- вперше проведені комплексні дослідження поверхневої активності отриманих флуоресцеїнвмісних кополіестерів у водних середовищах, розмірів частинок і стабільності їх дисперсій у воді, а також у водних розчинах білків плазми крові в залежності від природи мономерних ланок, їх співвідношення та вмісту флуоресцеїну у кополіестері;
- показано, що поліконденсація за реакцією Стегліха дозволяє отримувати флуоресцеїнвмісні кополіестери заданого складу та будови з керованими параметрами їх гідрофільно-ліпофільного балансу, здатністю до солюбілізації малорозчинних у воді сполук різної природи та їх вивільнення у неполярне середовище;
- встановлено взаємозв'язок будови амфіфільних флуоресцеїнвмісних кополіестерів з ступенем їх впливу на живі об'єкти і показано, що із збільшенням молекулярної маси гідрофільного фрагмента PEG у складі кополіестеру збільшується концентрація, при якій цитотоксичності не спостерігається.

Достовірність отриманих результатів та обґрунтованість висновків.

Отримані в дисертаційній роботі М.В. Яковів наукові положення і висновки є **новими, теоретично і експериментально обґрунтованими**, оскільки ґрунтуються на достатньо великому масиві експериментальних даних, отриманих з використанням різних хімічних, фізико-хімічних методів, і проаналізованих виходячи з класичних засад хімії високомолекулярних сполук та композиційних наноматеріалів, з урахуванням сучасного стану проблеми, тому їхня достовірність не викликає сумніву.

Достовірність та обґрунтованість викладених у дисертації наукових положень та висновків забезпечується фаховим вибором та застосуванням апробованих та надійних експериментальних методів синтезу та дослідження кополімерних матеріалів (^1H ЯМР спектроскопія, ІЧ спектроскопія у варіанті порушеного повного відбиття ATR-FTIR, спектрофотометрія, ексклюзивна хроматографія, визначення поверхневого натягу і ККМ, солюбілізаційних та інших характеристик), результати яких добре узгоджуються між собою, всебічним кваліфікованим аналізом одержаних даних, що підтверджується високим рівнем і обсягом наукових публікацій, успішною апробацією матеріалів дисертації на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях.

Практична значимість роботи

Розроблені Марією Яковів нові шляхи синтезу і отримані нею флуоресцеїнвмісні амфифільні кополіестери представляють значний практичний інтерес для створення нових засобів доставки ліків, а також проведення медико-біологічних досліджень. При взаємодії з мембранами клітин, вони проникають через них, здійснюючи доставку флуоресцентного маркера у внутрішні області клітини, що дає змогу прослідкувати їх рух у клітинному середовищі, що дуже важливо в біохімічних дослідженнях.

Наведені у дисертації приклади практичного використання отриманих результатів як оригінальні технічні рішення захищені двома патентами України, апробовані в Інституті біології тварин НААН України. При цьому показано, що одержані флуоресцеїнвмісні кополіестери не проявляють системної токсичності і можуть бути перспективними як полімерні маркери при створенні систем доставки ліків для їх візуалізації в органах чи тканинах.

Аналіз змісту дисертаційної роботи

Дисертаційна робота викладена на 209 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, п'яти розділів, висновків та списку цитованої літератури (186 посилань), включає 84 рисунки, 25 таблиць, проілюстрована схемами хімічних реакцій. Побудова роботи традиційна – огляд літератури передує опису основних експериментальних результатів та їх обговоренню, потім іде методика експерименту і три розділи оригінальних досліджень.

Перший розділ присвячений огляду сучасного стану проблеми в галузі створення нанорозмірних систем доставки ліків. Зроблено фаховий, детальний опис основних напрямів дослідження з урахуванням як вітчизняного, так і світового досвіду. Розділ написано на доброму теоретичному і практичному рівні і водночас легко і цікаво. Показано, що найбільш доцільним є використання кополімерів, які містять ковалентно зв'язані хромофорні фрагменти, здатні до флуоресценції. На основі проведеного огляду літератури сформовано мету дослідження.

В другому розділі наведено характеристики речовин, які використовуються у роботі, описано методики їх очистки, а також методики досліджень та аналізів.

Третій розділ присвячений розробленню методики синтезу амфифільних кополіестерів – псевдополіамінокислот, які містили би

хромофорні групи, здатні до флуоресценції, і, разом з тим, зберігали баланс властивостей, притаманний наноносіям. Для цього були проведені дослідження перебігу незворотної поліконденсації за реакцією Стегліха, підтверджено структури та охарактеризовано ряд отриманих амфифільних кополієстерів N-похідних глютамінової кислоти і полієтердіолів з хромофорними групами флуоресцеїну в макроланцюзі.

У **четвертому розділі** розглядаються результати досліджень колоїдно-хімічних властивостей синтезованих амфифільних флуоресцеїнвмісних кополієстерів. Показано, що такі амфифільні кополієстери понижують поверхневий натяг і здатні утворювати у водному розчині самостабілізовані дисперсії наночастинок. Вперше проведені комплексні дослідження поверхневої активності отриманих флуоресцеїнвмісних кополієстерів у водних середовищах, розмірів частинок і стабільності їх дисперсій в залежності від природи мономерних ланок, їх співвідношення та вмісту флуоресцеїну у кополієстері.

У **п'ятому розділі** наведено результати досліджень нових амфифільних кополієстерів на основі N-ацилпохідних глютамінової кислоти та полієтердіолів, макромолекули яких містять ковалентно зв'язаний флуоресцеїн, а також їх окремих складових *in vitro* на живих клітинах. Вперше встановлено взаємозв'язок структури і складу кополієстерів з параметрами, які визначають рівень їх нетоксичності. Встановлено, що із збільшенням молекулярної маси гідрофільного фрагмента PEG у складі кополієстеру збільшується концентрація, при якій цитотоксичності не спостерігається.

Висновки дисертаційної роботи ґрунтуються на широкому масиві експериментальних даних, логічно впливають із результатів роботи та об'єктивно відображають її зміст.

Як будь-яка нова, цікава робота, дисертація Марії Яковів викликає низку запитань, зауважень і побажань.

Зауваження і побажання до роботи.

1. На мою думку в дисертаційній роботі і авторефераті не зовсім вдало сформульовані об'єкт і предмет дослідження. В першому випадку слід було дати більш загальне формулювання, а не повторювати частково предмет дослідження, який виглядає ширшим за об'єкт.
2. В методичній частині при описі основних реактивів не для всіх вихідних речовин вказано їх походження (GluSt, GluLa, ДМФА, бензен, ДЦС та ін.).
3. При обґрунтування вибору реакції Стегліха для одержання флуоресцеїнвмісних кополієстерів, було б доцільно також розглянути і інші методи поліконденсації, які можна використати для синтезу таких продуктів.
4. В роботі не пояснено вибір органічних розчинників та їхніх сумішей для проведення реакції незворотної поліконденсації (Розділ 3).

Складається враження, що такий вибір зроблений чисто емпірично. Водночас вплив реакційного середовища на вихід і структуру продуктів досить суттєвий. Які ж фізико-хімічні властивості розчинників є найбільш важливими для встановлення оптимальних умов синтезу флуоресцеїнвмістних кополієстерів?

5. При представленні результатів гідролітичного розкладу полієстерів у водних розчинах автору слід було детальніше описати схему гідролізу полієстерів, показати які продукти утворюються, приділити увагу окремо вивільненню флуоресцеїну і подальшому розкладу макромолекул.
6. Як критерій стабільності водних дисперсій отриманих кополієстерів використано дзета-потенціал, однак не пояснено, який механізм впливу флуоресцеїну на величину ζ -потенціалу і чому збільшення концентрації кополієстеру приводить до збільшення значень ζ ?
7. Виходячи з оцінених молекулярних мас (1100-2500) отримані в результаті реакції кополієстеризації сполуки не є полімерами чи кополімерами. На олігомерну природу цих сполук вказує і характер ЯМР спектрів. Так що ж дає автору підстави відносити отримані кополієстери до класу полімерних матеріалів?
8. Список літературних джерел налічує 186 посилань, однак лише до десяти з них (не враховуючи праці автора) опубліковані за останні 5 років (2014-2018). Враховуючи бурхливий розвиток тематики в останні роки, можливо, слід було включити більше число сучасної літератури.

Висловлені зауваження ні в якій мірі не впливають на значимість основних положень і висновків дисертації, її наукової новизни та практичного значення. Одержані результати добре узгоджуються між собою, їх інтерпретація проведена в руслі сучасних уявлень в галузі хімії високомолекулярних сполук, колоїдної та медичної хімії.

Результати роботи повною мірою висвітлені у 42 наукових працях, з них - 14 статей як у вітчизняних фахових, так і в закордонних виданнях, і у виданнях суміжних галузей науки, оригінальність ідей і технічних рішень підтверджена двома патентами України. Робота добре апробована на наукових конференціях самого різного рівня. Автореферат цілком відповідає змісту дисертації, відображає всі основні її положення.

Все це дає підстави вважати, що дисертаційна робота М. С. Яковів відповідає високому науковому рівню та оформлена згідно існуючих вимог.

Робота є завершеним в рамках поставлених завдань дисертаційним дослідженням, в якому отримані нові, науково обґрунтовані результати, які

вирішують важливе наукове завдання - встановлення закономірностей синтезу флуоресцеїнвмісних амфіфільних кополієстерів N-похідних глутамінової кислоти з високою поверхневою активністю, що має істотне значення для хімії високомолекулярних сполук та вносить помітний вклад у фізико-хімію полімерів, медичну та колоїдну хімію, нанохімію і технологію полімерних матеріалів.

Дисертація Марії Яковів «Амфіфільні флуоресцеїнвмісні кополієстери N-похідних глутамінової кислоти, одержані за реакцією Стегліха» за актуальністю, новизною, науковим рівнем, вагомістю отриманих результатів та глибиною їхнього аналізу відповідає вимогам пунктів 9, 11, 12 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року зі всіма змінами та доповненнями, а також відповідає вимогам, що ставляться МОН України до кандидатських дисертацій, а її автор — Яковів Марія Василівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.06 — хімія високомолекулярних сполук.

Офіційний опонент:

Доктор хімічних наук, професор,
головний науковий співробітник
кафедри фізичної та колоїдної хімії
Львівського національного університету
імені Івана Франка



О.І. Аксіментьєва

Підпис д.х.н., проф. Аксіментьєвої О.І. засвідчую:

Вчений секретар
Львівського національного університету
імені Івана Франка, доцент



О.С. Грабовецька