

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Генераловой Аллы Николаевны «Мультифункциональные полимерсодержащие дисперсные микро- и наноструктуры для биотехнологии и биомедицины», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Современные исследования в области бионанотехнологии связаны с созданием новых современных материалов, среди которых важное место занимают микро- и наночастицы. Наряду с такими супрамолекулярными комплексами, как мицеллы, липосомы, дендримеры, капсулы и др., заслуженный интерес вызывают дисперсии полимерных частиц, получаемые методом гетерофазной полимеризации. Такие частицы характеризуются высокоразвитой поверхностью, коллоидной стабильностью, возможностью получения в широком диапазоне диаметров (10 нм-1мм) с узким распределением по размерам, с различной морфологией и функциональностью. Присоединение биологически активных молекул к полимерным частицам позволяет создать гибридные органо-неорганические структуры, что значительно расширяет область их применения. Несмотря на большое количество методов синтеза, актуальной задачей остается разработка возможности получения набора полимерных частиц с различными характеристиками, универсального и простого синтеза с участием минимального вариантов мономеров. Решение данной задачи в диссертационной работе Генераловой А.Н. представлено на примере синтеза линейки частиц на основе полиакролеина с широким диапазоном свойств, контролируемых как на стадии синтеза, так и при модификации уже готовых частиц.

Другим направлением исследования является получение частиц нанометрового диапазона (<100 нм), которые успешно себя зарекомендовали как неорганические наночастицы, обладающие уникальными физико-химическими и оптическими свойствами. Фотолюминесцентные наночастицы, позволяют разработать наиболее чувствительные методы анализа, основанные на детекции флуоресцентного сигнала. В диссертационной работе в качестве таких наночастиц использованы квантовые точки и нанофосфоры с антистоксовой флуоресценцией, которые обладают фото- и химической стабильностью, имеют узкие пики эмиссии, большую спектральную разницу между длинами волн возбуждения и флуоресценции. Традиционно оба типа частиц синтезируют в среде органических растворителей, что затрудняет их использование для биовизуализации. В диссертационной работе Генераловой А.Н. данная актуальная

проблема решается путем получения биосовместимых коллоидно-стабильных водных дисперсий включением наночастиц в полимерные микрочастицы и их модификацией природными и синтетическими полимерами.

Новым научным направлением работ, представленным в диссертационной работе Генераловой А.Н., является разработка принципов получения структурированных наносистем на основе полимерных частиц и неорганических флуоресцирующих материалов, модификация поверхности новых частиц различными полимерами, белками и лигандами для использования в различных областях медицинской биотехнологии и биомедицины.

Диссертация написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, представления полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы.

В «Обзоре литературы» рассмотрено значительное число публикаций, включая исследования последних лет. В первой части представлены различные способы получения дисперсий полимерных частиц методом гетерофазной полимеризации, как подход к дизайну мультифункциональных дисперсий для медико-биологических и биотехнологических исследований. Рассмотрены возможности управления диаметрами полимерных частиц и их распределением по размерам, свойствами поверхности, коллоидной стабильностью, а также способы получения частиц с различной функциональностью, в том числе определяемой стимул-чувствительными полимерами. Продемонстрированы подходы к введению неорганических наночастиц в объем и на поверхность, что является важным этапом при формировании гибридных частиц. Кроме того, освещены способы получения биореагентов на основе микрочастиц, приведены примеры их участия в биоанализах. Вторая часть обзора литературы посвящена описанию основных свойств, синтезу, модификации и применению фотолюминесцентных неорганических наночастиц. В обзоре описаны флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, так называемые квантовые точки (КТ), у которых максимум флуоресценции определяется размером наночастиц, что позволяет получать флуоресценцию различных цветов при возбуждении источником с одной длиной волны. Это определяет уникальные оптические и физико-химические свойства КТ, выгодно отличающие их от традиционных флуорофоров. Вторым типом наночастиц в обзоре представлен нанофосфорами с антистоксовой флуоресценцией, в которых реализуется эффект апконверсии, заключающийся в преобразовании низкоэнергетического излучения из ближнего ИК-диапазона в УФ-, видимый и ИК-свет с более высокой энергией за счет протекания нелинейных многофотонных процессов. Феномен апконверсии приводит к

уникальным возможностям биовизуализации с помощью данных наночастиц, включая минимальное фотоповреждение живых организмов, низкую фоновую флуоресценцию, высокое отношение сигнал/шум и пространственное разрешение, в сравнении с обычными флуоресцентными метками. В обеих частях обзора подробно рассмотрено применение всех перечисленных типов частиц в биотехнологических процессах, включая диагностику, биораспределение частиц в организме лабораторных животных, в цитологических исследованиях, визуализации раковых клеток, определение цитотоксичности, адресную доставку, фотодинамическую терапию. Важно отметить, что автор рассматривает все перечисленные выше примеры совместно с методами структурной модификации различных типов частиц и учетом методов регистрации сигналов, которые преимущественно относятся к флуоресценции. Этот анализ в дальнейшем лег в основу экспериментальных работ, выполненных самой Генераловой А.Н. и является по сути третьей частью диссертации.

В **«Экспериментальной части»** диссертации подробно изложены методы получения различных типов полимерных частиц, их комплексов с неорганическими частицами, разными векторами, белками. Особое внимание уделено разработке методов модификации квантовых точек и анконвертирующих нанофосфоров, в том числе включение в полимерные частицы. Автор подробно рассматривает использованные методы регистрации флуоресценции описанных частиц.

Раздел **«Результаты и их обсуждение»** построен по тем же принципам, которые были использованы в предыдущих разделах. В первой части изложены подходы для получения коллоидно-стабильных микрочастиц на основе акролеина в широком диапазоне диаметров (0.15-2 мкм) с узким распределением по размерам методом осадительной полимеризации в водно-щелочной среде, а также его радикальной безэмульгаторной сополимеризацией со стиролом. Продемонстрирована возможность управления свойствами микрочастиц на стадии синтеза путем введения органических красителей, аминов, апконвертирующих нанофосфоров, проведением реакции радикальной сшивки. Данные универсальные подходы позволили синтезировать микрочастицы с набором ценных свойств и создать на их основе микроструктуры, которые были успешно использованы для целого спектра важных биомедицинских применений, включая определение в реакции латексной агглютинации антител к антигенам чумы, бруцеллеза, липополисахаридам клеточной стенки условно-патогенных бактерий, тиреоглобулина, а также для детекции дифтерийного токсина, тиреоглобулина и др.. Подход к разработке анализа на основе данной реакции представлен на примере определения гаптена, гербицида 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, в формате реакции

ингибирования латексной агглютинации с визуальной регистрацией результатов (предел обнаружения 0,25 нг/мл), а также со спектрофотометрической детекцией, что позволяет исследовать кинетические закономерности протекания реакции латексной агглютинации.

В диссертационной работе автор демонстрирует широкие возможности применения синтезированных гибридных органо-неорганических микрочастиц (при введении КТ в объем предварительно полученных частиц), которые могут выступать в качестве биореагентов в реакции латексной агглютинации, а также в качестве эффективных визуализирующих меток клеточных рецепторов. Участие апконвертирующих наночастиц на стадии синтеза позволило управлять свойствами получаемых полиакролеиновых микрочастиц, что определило применение микроструктур на их основе для исследования биораспределения в *in vivo* экспериментах.

Кроме того, важным этапом работы было получение микрочастиц со стимул-чувствительной флуоресценцией. Так, включение КТ в состав полиэлектролитных комплексов на поверхности микрочастиц лежит в основе дизайна микроструктур с рН-чувствительной флуоресценцией, которые могут быть использованы в качестве оптического сенсора для определения  $\text{Cu}^{2+}$  (предел обнаружения 15 нМ). Введение КТ в слой термочувствительного полимера (поли-N-винилкапролактама) на поверхности микрочастиц позволило создать микроструктуры, характеризующиеся температурно-зависимой флуоресценцией, которые были успешно применены для мониторинга изменения температуры в микрообъеме.

Разработан эффективный метод получения гидрофилизированных коллоидно-стабильных апконвертирующих нанофосфоров с различной функциональностью и низкой цитотоксичностью. Данный метод позволил создать наноструктуры на основе нанофосфоров, модифицированных амфифильным сополимером, с таргетным белком барстаром в качестве компонента высокоаффинного модуля «барназа-барстар» для визуализации рецепторов на поверхности раковых клеток. Благодаря разработанному способу модификации была сформирована оболочка из полиэтиленгликоля на поверхности нанофосфоров, что увеличило время их циркуляции в кровеносной системе до 1 часа и позволило визуализировать границы солидной опухоли за счет их накопления при реализации эффекта увеличенного проникновения и удержания (EPR-effect). В работе также разработан метод получения наноструктур на основе гидрофилизированных нанофосфоров с эндогенным фотосенсибилизатором рибофлавином, в которых происходит резонансная передача энергии при возбуждении ИК-светом. Особенностью диссертационной работы Генераловой А.Н. является ее комплексность, включающая в себя различные области исследований, в том числе большой набор биотехнологических и

биомедицинских исследований. Эти работы в области диагностики биологических объектов методом латексной агглютинации с использованием окрашенных частиц заданного размера показали высокую чувствительность и специфичность с широким кругом объектов. Практически все методы использования частиц в биологических и медицинских исследованиях, приведенные в разделе «Обзор литературы» были воспроизведены на разработанных Генераловой А.Н. препаратах и показали положительные результаты. Эти результаты имеют большое практическое значение, так как дают научную базу для создания отечественного производства высококлассных реагентов для биомедицины и диагностики и позволяют осуществить импортозамещение указанных препаратов. Особую важность приобретают результаты с использованием флуоресцирующих частиц, обладающих высокой чувствительностью и биодоступностью. Представлен подход к проведению фотодинамической терапии опухоли под действием ИК-света, который глубоко проникает в биоткани, а полученная наноструктура несет диагностическую и терапевтическую функции и может быть рассмотрена, как перспективный тераностический агент.

Графический и табличный материал диссертации в полной мере иллюстрируют теоретические и методические положения диссертации и полученные в ней экспериментальные результаты. Диссертационная работа завершается разделом, в котором сформулированы основные **выводы** по работе. Автореферат отражает содержание диссертации.

Вместе с тем, по диссертации можно сделать следующие замечания:

- 1) Результаты биологических исследований освещены без указания конкретных данных о свойствах антигенов, антител, типов клеток, условий проведения анализов, что не дает возможности глубже оценить достоинства разработанных частиц.
- 2) Большое количество приведенных исследований не позволило привести данные стандартных исследований, которые играли бы роль референс исследований и контроля. Это ограничивает возможность обсуждения преимуществ тех или иных методов.

Несмотря на указанные замечания, большинство результатов исследования опубликовано в отечественных и зарубежных изданиях, где эти недостатки, по-видимому, учтены. В целом работа очень хорошо иллюстрирована и написана в научном стиле.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что диссертационная работа Генераловой А.Н. является законченным исследованием, представляющим значительный вклад в создание дисперсных микро- и наноструктур для биотехнологии и биомедицины. Материалы диссертации в полной мере отражены в статьях в

рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, а также были представлены на всероссийских и международных конференциях. Несомненна практическая ценность проведенной работы.

Давая общую оценку диссертации Генераловой Аллы Николаевны, считаю, что по своей актуальности, научной новизне, значимости полученных результатов она соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Академик РАН, доктор биологических наук  
профессор, главный научный сотрудник  
химического факультета Федерального  
государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
образования «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова».  
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, дом 1,  
строение 11Б.  
Тел. (495) 939-27-24. E-mail: alex.m.egorov@gmail.com

Егоров А. М.

« 19 » ноября 2019 г.

Личную подпись  
ЗАВЕРЯЮ:  
Нач. отдела дел  
химического факультета

Ларионов

