

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)

Диссертационная работа Генераловой А.Н. является междисциплинарным исследованием и посвящена разработке основных концепций получения и применения дисперсных микро и наноструктур для решения задач биотехнологии и биомедицины. Микро и наноструктуры формируются на основе частиц, позволяющих проводить исследования в малом объеме, с минимальным расходом реагентов, при низкой цене и сохранении чувствительности и специфичности. Кроме миниатюризации формата анализов, существует возможность создания на основе частиц сложных структурированных систем с набором особых свойств, которыми не обладают индивидуальные частицы. Структуры могут быть получены в виде комплексов частиц с биологически активными молекулами, функциональными полимерами, а также в виде гибридных частиц, сочетающих органические и неорганические модальности. Мультифункциональные свойства микро- и наноструктур позволяют разрабатывать новые методы биоанализа, диагностики, терапии, решать задачи биовизуализации, доставки лекарственных средств и т.д. Кроме того, такие свойства частиц, как наличие большой площади поверхности, возможность управления размерами, коллоидной стабильностью, функциональностью поверхности частиц, а также последние достижения в области функциональных полимеров, в области получения частиц неорганической природы с уникальными фотофизическими и химическими свойствами ведут к ускорению перехода к персонализированной медицине.

Одними из перспективных являются полимерные микрочастицы (0.1-2 мкм), получаемые методом гетерофазной полимеризации благодаря большому разнообразию подходов для ее проведения. Однако для каждого вида анализа требуются частицы с набором особых свойств, что вызывает необходимость создания специального метода синтеза, а это представляет собой сложную и трудоемкую процедуру. Поэтому актуальной задачей является разработка универсальных, простых способов полимеризации и методов модификации, легко адаптируемых для получения частиц, отвечающих особым требованиям каждого анализа. В диссертационной работе эта задача успешно решается при использовании осадительной анионной полимеризации акролеина и сополимеризации последнего со стиролом, а также с последующей модификацией частиц, что позволяет создавать микроструктуры для различных приложений.

Наноструктуры в работе были получены на основе неорганических наночастиц (<100 нм), поскольку существует ряд трудностей при синтезе частиц из нанометрового диапазона методом гетерофазной полимеризации (сложно контролировать размер, необходимо использовать высокие концентрации ПАВ и т.д.). В работе Генераловой А.Н. решается актуальная задача создания коллоидно-стабильных гидрофилизированных образцов наночастиц с антистоксовой флуоресценцией методом замены растворителя, проводимого без использования агрессивных реагентов. Этот подход лег в основу получения полимер-модифицированных наноструктур, которые выступали в качестве биореагентов как в *in vitro*, так и в *in vivo* исследованиях, а также позволили решать задачи тераностики.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, содержащую основные методы получения и исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список литературы.

В первом разделе главы «Обзор литературы» рассмотрены способы получения мультифункциональных дисперсий полимерных частиц в процессе гетерофазной полимеризации, которая обеспечивает тщательный контроль как макромолекулярных, так и коллоидных свойств. Продемонстрированы подходы, которые в соответствии со способом полимеризации позволяют регулировать диаметр и форму частиц, их распределение по размерам, коллоидную стабильность, морфологию, химию поверхности и функциональность, а также образование органо-неорганических гибридных полимерных частиц. Представлен обзор возможных применений частиц в гомогенном и гетерогенном биоанализах, а также для маркирования клеточной поверхности. Использование частиц позволяет уменьшить масштаб реакций, снизить затраты, повысить скорость, чувствительность, селективность, воспроизводимость анализов. Во втором разделе главы «Обзор литературы» представлены фотолюминесцентные неорганические наночастицы: полупроводниковые нанокристаллы, известные также как квантовые точки (КТ), и нанофосфоры с антистоксовой флуоресценцией, возникающей в результате процесса апконверсии (НАФ). Рассмотрены уникальные оптические и физико-химические свойства КТ, флуоресценция которых зависит от размера частиц и может возбуждаться одним источником света, что их выгодно отличает от органических флуоресцентных молекул. В обзоре подробно описан процесс излучения и факторы, его определяющие, во втором типе наночастиц (НАФ) при возбуждении их флуоресценции светом из ближнего ИК-диапазона (975 нм), который преобразуется в УФ-, видимый и ближний ИК-свет за счет протекания нелинейных многофотонных процессов. Это позволяет проводить визуализацию на глубине биоткани с минимальным фотоповреждением, высоким пространственным

разрешением, а также минимизировать автофлуоресценцию биоткани, что отличает НАФ от традиционных флуоресцентных меток. Для обоих типов наночастиц представлены методы гидрофилизации, подходы к созданию наноструктур и их применение в биомедицине. Рассмотрение самых последних современных литературных данных позволили Генераловой А.Н. правильно сформулировать цель и задачи диссертационной работы.

Достоверность приведенных в диссертации результатов не вызывает сомнений и подтверждается использованием современного оборудования и комплекса различных физико-химических, биологических методов исследования, что нашло отражение в главе «Экспериментальная часть».

Изложение и обсуждение результатов представлено в третьей главе «Результаты и их обсуждение», состоящей из двух разделов, в первом из которых рассмотрены подходы к дизайну дисперсных микроструктур с участием органических соединений и неорганических наночастиц, а во втором – получение и применение наноструктур на основе нанофосфоров.

Дисперсии микрочастиц получали с использованием простого, легко адаптируемого под необходимые требования метода анионной осадительной полимеризации акролеина с возможностью расширения набора свойств за счет радикальной сополимеризации со стиролом. Синтезирован набор микрочастиц, удовлетворяющих требованиям различных видов биоанализа благодаря эффективному управлению коллоидными и химическими свойствами микрочастиц, реализованному путем введения органических красителей, аминов, НАФ на стадии синтеза, а также при проведении реакции сшивки. Полученные частицы явились основой для создания микроструктур с биофункциональными соединениями для проведения анализов в формате реакции латексной агглютинации с визуальной и инструментальной детекцией результатов на примере определения низкомолекулярного гербицида 2,4-дихлорфеноксисуксинной кислоты, а также для исследования биораспределения микрочастиц *in vivo*. На основе гибридных микрочастиц, полученных при введении КТ после синтеза, созданы микроструктуры для специфической визуализации взаимодействий биомолекул в реакции латексной агглютинации и на поверхности клеток. Показана возможность формирования гибридных стимул-чувствительных микроструктур с включением КТ в приповерхностный слой микрочастиц. Так, создание полиэлектролитных комплексов на поверхности и введение в них КТ лежит в основе дизайна оптического сенсора для определения ионов меди (II) и позволяет получать частицы с рН-чувствительной флуоресценцией. В случае инкапсуляции КТ в слой термочувствительного полимера на поверхности микрочастиц получены гибридные

микроструктуры с термочувствительной флуоресценцией, которые нашли применение в качестве биосенсора для мониторинга протекания экзотермических реакций.

Во втором разделе главы «Результаты и их обсуждение» представлена модификация НАФ с использованием метода замены растворителя для получения коллоидно-стабильных наночастиц с различной функциональностью и низкой цитотоксичностью. Созданы наноструктуры с белком барстаром в качестве компонента высокоаффинного модуля барназа-барстар, которые продемонстрировали специфичную визуализацию рецепторов на поверхности раковых клеток. Использование разработанного метода модификации позволило получить наноструктуры на основе НАФ, характеризующиеся эффективным накоплением в солидной опухоли за счет увеличения времени циркуляции в кровотоке лабораторных животных благодаря созданию на поверхности НАФ «короны» из молекул полиэтиленгликоля. Найдено, что наноструктуры НАФ с эндогенным фотосенсибилизатором рибофлавином, в которых реализуется резонансная передача энергии, позволяют проводить фотодинамическую терапию опухолей при возбуждении ИК-светом.

Общие замечания по диссертационной работе:

1. В работе рассматриваются способы получения микрочастиц на основе акролеина, наполненных органическими красителями и неорганическими нанокристаллами (квантовыми точками), но не приведен сравнительный анализ их преимуществ и недостатков.
2. Для проведения реакции латексной агглютинации со спектрофотометрической детекцией результатов были получены конъюгаты частиц с антителами при участии спэйсерной молекулы, в частности, аминокaproновой кислоты. Использовали ли данный подход к получению конъюгатов через спэйсерные молекулы в других видах анализа и имели ли они какие-либо преимущества?
3. В диссертации показаны уникальные свойства и несомненные преимущества применения НАФ в *in vivo* исследованиях. Однако для представления более полной картины, желательно, чтобы были приведены данные по накоплению НАФ в органах ретикуло-эндотелиальной системы.
4. В работе не нашел отражение вопрос о собственной токсичности рибофлавин мононуклеотида при отсутствии облучения в сравнении с традиционными фотосенсибилизаторами.

Данные недостатки являются непринципиальными и не снижают благоприятного впечатления от работы.

В целом, результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями в области нанобиотехнологии, которые определяют методологию получения и применения дисперсных микро- и наноструктур для биомедицинских исследований. Положения диссертации, выносимые на защиту, в полной мере изложены в статьях в рецензируемых научных журналах, а также были представлены на многочисленных конференциях, симпозиумах, рабочих совещаниях. По актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, практической значимости диссертационная работа Генераловой А.Н. 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 несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Член-корр. РАН, доктор химических наук
профессор, зав. лабораторией молекулярных основ
действия физиологически активных соединений
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32
тел.: (495) 135-05-90; e-mail: kochet@eimb.ru

Кочетков С.Н.

Подпись член-корр. РАН, д.х.н. Кочеткова С.Н.
«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН

К.В.Н.

« 18 » _____ 2019 г.

Бочаров А.А.

