

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
«Сколковский институт науки и технологий»
121205, Москва, Большой бульвар д.30, стр.1
ОГРН 1115000005922 ИНН/КПП 5032998454/503201001
Тел.: +7 (495) 280-14-81, факс +7 (495) 280-14-82

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)

Нано- и наноструктурированные микрочастицы интенсивно используются в современной биотехнологии. Без их применения невозможным представляется не только изучение состава и методов анализа клеточных структур, но и проведения таких важных биотехнологических процессов, как экстракции, выделения, фракционирования, очистки, контроля и хранения конечных целевых продуктов. Особое значение нано- и микроструктурированные частицы приобрели в связи с развитием методов проточной флуоресцентной цитометрии и клеточных сортеров. Кроме того, данные системы перспективны в клинической практике не только для решения задач диагностики, но и для визуализации границы патологической и нормальной ткани, а также могут рассматриваться в качестве систем доставки лекарств. Во всех перечисленных случаях ключевыми проблемами являются, как синтез частиц с воспроизводимыми параметрами, так и химическая модификация поверхности распознающими молекулами. В связи с этим разработанные в ходе выполнения докторской диссертации стратегии создания микро- и наноструктур, как на основе полимерных частиц, получаемых методом гетерофазной полимеризации, так и на основе полимер-модифицированных неорганических наночастиц имеют хорошие перспективы для дальнейшего практического использования. В связи с этим постановка задачи диссертационной работы А.Н. Генераловой обоснована, а ее тема, несомненно, актуальна и важна для разработки основных концепций, методов и экспериментальной реализации *in vitro* и *in vivo* диагностики. Выполненная работа представляет собой системное исследование, в котором ставится и решается важная задача современной бионанотехнологии, а именно создание платформ на основе нано- и микрочастиц, которые можно использовать для задач диагностики и терапии. Системность работы определяется сочетанием большого числа экспериментальных методов исследования для обеспечения необходимых параметров частиц, включая их

поверхностную модификацию, и результаты данной работы внесли значительный вклад в получение новых знаний в нанобиотехнологиях. Практическую значимость работы, как один из примеров, показательно иллюстрирует Таблица III.6 (Тест-системы, разработанные на основе полиакролеиновых частиц M1).

Основные результаты, полученные автором и имеющие принципиальную научную новизну, состоят в следующем:

- продемонстрирована возможность управления коллоидными и химическими свойствами полиакролеиновых микрочастиц путем введения второго мономера, органических красителей, аминов, проведением реакции радикальной сшивки, что определяет получение микрочастиц с широким спектром свойств и создание на их основе микроструктур с биологически активными молекулами, стимул-чувствительными полимерами, неорганическими наночастицами;

- микроструктуры на основе гибридных частиц, допированных КТ (после синтеза) и конъюгированных с антителами, выступают в качестве биореагентов в реакции латексной агглютинации и являются эффективными визуализирующими агентами клеточных рецепторов, что продемонстрировано на примере маркирования рецептора HER-2neu на поверхности клеток SKOV-3;

- показано, что введение 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 Cu^{2+} с пределом обнаружения 15 нМ;

- получены микроструктуры с термочувствительной флуоресценцией путем включения КТ в слой стимул-чувствительного полимера (поли-N-винилкапролактама) на поверхности микрочастиц, что дало возможность проводить мониторинг изменения температуры в микрообъеме с точностью 0.1°C;

- найдено, что наноструктуры НАФ, модифицированных амфифильным полимером, с белком барстаром в качестве компонента высокоаффинного модуля барназа-барстар позволяют визуализировать рецепторы на поверхности раковых клеток, при этом флуоресцентный сигнал детектируется через 1.6 мм-слой фантома биоткани.

- при создании оболочки из полиэтиленгликоля на поверхности гидрофилизированных НАФ зарегистрировано увеличение времени циркуляции в кровеносной системе до 1 часа, что привело к эффективному накоплению НАФ в опухоли и позволило визуализировать ее границы.

- продемонстрировано, что наноструктуры НАФ с эндогенным фотосенсибилизатором рибофлавином, в которых реализуется резонансная передача энергии при возбуждении ИК-светом, являются тераностическими агентами, визуализирующими опухоль и приводящими к ее деградации под действием ИК-излучения.

Указанные новые закономерности и эффекты, в совокупности с предложенными конкретными экспериментальными методиками, реализованными как на модельных, так и реальных объектах, в частности для биоанализа, биоимиджинга, а также создания новых систем доставки лекарств определяют практическую значимость данной работы.

Комплексный, системный и многоплановый подход к решению поставленной задачи, широкий спектр современных методов исследования, а также соответствие результатов, полученных разными методами являются основой высокой степени обоснованности и достоверности полученных автором научных положений, выводов, рекомендаций и новизны результатов.

Диссертационная работа изложена на 247 страницах, содержит 77 рисунков, 17 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения и обсуждения результатов, выводов и списка литературы (417 наименований). Обзор литературы отличается системностью анализа литературных данных, их критическим обсуждением и постановкой задач исследования.

Замечания и вопросы, которые можно сделать по данной работе не носят принципиального характера:

1. В работе использовалась модификация поверхности частиц НАФ молекулами полиэтиленгликоля для увеличения времени циркуляции в кровеносной системе. Как молекулярная масса полиэтиленгликоля влияет на время циркуляции частиц? Если экспериментов, направленных на оптимизацию молекулярной массы ПЭГ не проводилось, то из каких соображений был выбран ПЭГ, который был использован в работе?
2. Из текста работы не совсем понятно проводились ли исследования гемосовместимости нано- и микрочастиц, которые обычно предваряют *in vivo* эксперименты. Если такие эксперименты проводились, то как модификация поверхности нано- и микрочастиц влияет на их гемосовместимость?
3. Как было показано ранее в работах Вольфгана Парака и других авторов определяющее значение в биораспределении частиц имеет так называемый “корона” эффект, заключающийся в адсорбции белков плазмы крови на поверхность частиц. Хотелось бы услышать комментарии автора о том, как изменится дзета-потенциал и

размер частиц вследствие взаимодействия поверхности наночастиц с белками плазмы крови?

4. Автор использовал в работе направляющие молекулы, например миниантитела 4D5scFv. Исследовалась ли стабильность данных молекул на поверхности частиц *in vitro* и *in vivo*?
5. Стр.85. Очистка полимерных дисперсий. Автор дает информацию о режимах работы центрифуги в об/мин, необходимо дублировать этот параметр в g, эти данные дают возможность воспроизвести результаты, полученные автором, используя центрифуги других производителей.
6. Стр.101. Автор использует для модификации в 15 раз большую концентрацию ПЭИ (15 мг/мл), чем обычно используют в технологии последовательной адсорбции (Layer by Layer assembly), с чем связана эта необходимость?
7. Стр.114. Рисунок III.2. Почему зависимости выходят на плато? Почему наличие красителя так сильно влияет на диаметр частиц?

Замечания по оформлению работы:

1. Стр.15-16, табл. I.1. было бы полезно в таблице дать ссылку в каждой из строк на конкретную статью, где исследовалось то или иное свойство (параметр) частиц.
2. Стр.49-50, табл. I.2 было бы также полезно дать на каждый метод ссылку на статью, которую можно было рассматривать, как пример реализации данного метода.
3. Стр.51, рисунок I.7, введение обозначений внутри схемы и расшифровка в подписи под рисунком существенно упростило бы понимание схемы.
4. Молекулярная масса используемых полиэлектролитов является важнейшим параметром, определяющим многие их свойства, в связи с этим было бы полезно приводить эту информацию по тексту диссертационной работы вместе с их концентрацией в растворе и составе растворителя.
5. стр.101. Таблица III.15 Значение дзета-потенциала частиц приводится в следующем формате -21.42 ± 2.1 мВ, не имеет смысла оставлять числа после запятой с учетом величины абсолютной погрешности измерений, т.е. более корректным в данном случае будет следующее представление -21 ± 2 мВ.

Предложенные методы, подходы и полученные результаты могут быть использованы при чтении лекций и в научно-исследовательской работе в Московском, Нижегородском, Саратовском, Казанском, Томском государственных университетах, РХТУ, Санкт-Петербургском и Томском политехе, МИФИ, Московском физико-

техническом институте, Национальном медицинском исследовательском радиологическом центре Министерства здравоохранения РФ, а также других научных и отраслевых учреждениях, деятельность которых связана с использованием нано - микрочастиц для биоанализа и биоимиджинга, а также для создания систем доставки лекарств.

Содержание диссертации, полностью отражено в автореферате и соответствует указанной специальности. Автореферат дает полное представление о вкладе автора, новизне и значимости результатов. По материалам диссертации опубликовано 49 оригинальных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, зарегистрировано 3 патента, опубликовано более 60 тезисов докладов на российских и международных конференциях, 1 глава в монографии.

Хочется отметить высокий уровень журналов, в которых были опубликованы результаты работы, например Nanoscale, Nanoresearch, RSC Advance, Colloids and Surface B, Scientific Reports, которые показывают уровень работы, актуальность и признание мировым научным сообществом. Работа прошла апробацию на многочисленных международных и всероссийских конференциях самого высокого уровня с 1989 г. по 2018 г., что свидетельствует о высокой квалификации автора работы.

Диссертация Генераловой Аллы Николаевны 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).

Профессор центра фотоники и
квантовых материалов Автономной
некоммерческой образовательной
организации высшего образования
«Сколковский институт науки и технологий»,
д.х.н.

121205, Москва, Большой бульвар д.30, стр.1
тел. +7 (917) 207 76 30. e-mail: d.gorin@skoltech.ru

Подпись д.х.н., профессора Горина Д.А.

«Удостоверяю»

«18» ноября 2019 г.

МП




/Горин Д.А./

РУКОВОДИТЕЛЬ ОТДЕЛА
КАДРОВОГО АДМИНИСТРИРОВАНИЯ

