

Отзыв официального оппонента

о диссертации Поповой Виктории Константиновны
"Новые способы синтеза наноматериалов
карбоната кальция, диоксида кремния и их
композитов как носителей биологически активных
соединений", представленной на соискание ученой
степени кандидата химических наук по
специальности 1.4.9. Биоорганическая химия

Диссертационная работа посвящена разработке новых подходов к конструированию наночастиц, модифицированных биологически активными веществами: стрептавидин, олигонуклеотиды, цитостатический препарат доксорубицин. Связывание подобных соединений с различными объектами наноразмерного диапазона (50-200 нм) достаточно давно рассматривается в качестве перспективного подхода к улучшению полезных свойств фармацевтических препаратов. Основные достигаемые результаты заключаются в пролонгировании действия препаратов; создании лекарственных форм, нацеливаемых на определённые мишени в организме; повышении эффективности проникновения препарата в клетки за счёт эндоцитоза. В качестве наноразмерных носителей предлагаются природные и синтетические полимеры, липосомы, неорганические наночастицы. Представители каждого класса носителей имеют определённые преимущества и недостатки, например, многие синтетические полимеры плохо разлагаются в организме, получение их в монодисперсном виде сопряжено с существенными технологическими трудностями. Использование биоразлагаемых органических конструкций, включая природные, на первый взгляд кажется более предпочтительным, но их деструкция в организме может приводить к образованию олигомерных или низкомолекулярных продуктов с зачастую непонятной структурой, активностью и токсичностью. Преимуществом неорганических наночастиц (карбонат и фосфат кальция, кремнезём, гидроокись алюминия) является очевидность их биодеструкции до безвредных ионов или кремниевой кислоты. В то же время, получение неорганических наночастиц, загруженных биологически активными препаратами, является сложной многофакторной задачей, состоящей из нескольких стадий:

- формирование неорганических наночастиц требуемого размера, однородных по размеру;
- модификация наночастиц для иммобилизации целевого препарата;

– собственно иммобилизация препарата.

На всех стадиях синтеза требуется иметь суспензионно-стабильные композиции, причём модификация наночастиц не должна сопровождаться их деструкцией с потерей размерной однородности. К настоящему времени накоплен достаточно большой опыт по синтезу кальциевых и кремнистых наночастиц, в частности, для целей регенеративной медицины, при моделировании процессов биоминерализации. В то же время, неорганические наночастицы недостаточно активно используются для конструирования биологически активных препаратов фармакологического назначения, вероятно, из-за указанных выше сложностей.

Таким образом, разработка новых подходов к синтезу функционализированных неорганических наночастиц фармакологической направленности является актуальной научной задачей. В работе В. К. Поповой разработаны новые способы решения этой задачи, имеющие существенное значение для создания новых лекарственных и диагностических препаратов:

- разработаны воспроизводимые методы синтеза наночастиц диаметром до 200 нм на основе карбоната и фосфата кальция, а также кремнезёма. Оптимизированы условия синтеза, включая стабилизаторы и соотношения реагентов, для получения частиц, дающих устойчивые суспензии после центрифугирования и ресуспендирования в средах, близких к физиологическим. Введение смешанного оксида железа позволило придать частицам магнитные свойства;
- апробированы различные способы модификации наночастиц для введения в них целевых веществ. Рассмотрены классические способы, хорошо известные также для макро- и микрообъектов с использованием этоксисиланов, стрептавидина, активированных красителей и олигонуклеотидов. В случае наночастиц эти способы имеют определённые методические проблемы, которые были успешно преодолены с получением искомых продуктов;
- на мой взгляд особый интерес представляет модификация с помощью нейлона-6, который представляет собой нерастворимое вещество, содержащее гидролизующиеся в организме амидные группы. Использование кальциевых или кремнистых наночастиц в качестве матриц для синтеза полых наночастиц из нейлона-6 позволяет получать нанокапсулы из этого материала, которые могут представлять значительный интерес далеко за пределами данной работы. Например, можно предположить использование этих наноконтейнеров для

введения различных веществ (красители, антипирены, стабилизаторы) в промышленные пластики и лакокрасочные материалы;

- продемонстрирована применимость новых продуктов для решения практически значимых задач: выделения специфических белков из клеточного лизата, иммобилизации противоопухолевого препарата доксорубицина с получением наночастиц, способных к pH-контролируемому выделению препарата с сохранением его цитостатического действия.

В. К. Попова продемонстрировала высокую квалификацию в области биоорганической химии и смежных областях, в работе выполнен полный цикл по созданию наноразмерных продуктов биомедицинского назначения, включая синтез базовых наночастиц, их исследование, модификацию и загрузку целевыми биологически активными препаратами. Завершение работы экспериментами на культурах клеток подтверждает как квалификацию автора, так и перспективность полученных продуктов.

Диссертационная работа построена по классической форме, содержит 3 главы, посвящённые обзору литературы, описанию методик экспериментов и обсуждению результатов, изложена на 173 страницах, включая 26 таблиц, 56 рисунков и список литературы из 377 наименований.

Литературный обзор занимает 54 страницы и разделён на две части, первая из которых посвящена описанию синтеза наночастиц карбоната кальция. Далее рассматривается применение наночастиц карбоната кальция в биомедицине. Литературный обзор основан на англоязычных источниках, в основном последних 10-ти лет. В качестве замечания по данному разделу можно отметить:

1. В разделе 2.2.2., посвящённом системам доставки нуклеиновых кислот в клетки, не упомянуты полимерные амины, некоторые из которых, например, полиэтиленмин, используются для трансфекции как коммерческие препараты.
2. Существенная часть работы посвящена кремнезёмным наночастицам, которые не рассмотрены в обзоре литературы.
3. В качестве значительного достижения авторы приводят высокую стабильность кальциевых наночастиц в суспензии. В литературном обзоре следовало рассмотреть известные данные по стабильности частиц аналогичного размера.

Во втором разделе представлено описание использованных материалов и методов. К этой части работы имеются следующие вопросы и замечания:

4. При описании использованных реактивов (стр. 74) следует не ограничиваться общими названиями и указанием фирмы-поставщика, а предоставлять существенную информацию о составе, чистоте, методах очистки. Например, ключевой реагент - хлорид кальция существует в безводном и гидратированном виде, и для каждого из них существует свои особенности в смысле чистоты и стабильности состава. На с. 75 есть упоминание об очистке растворителей, но нет информации о методах очистки или показателях чистоты. Это особенно критично в случае этанола, используемого для гидролиза ТЭОС. Каков источник нейлона-6 и его молекулярная масса?

5. Методики синтеза наночастиц (с. 77) описаны излишне кратко, с указанием концентраций реагентов в очень широких пределах. Это правильно если в дальнейшем, при описании результатов экспериментов, приводятся конкретные параметры синтезов, но они отсутствуют. Непонятно, как проводили синтез в изопропанол, растворимы ли в нём безводный хлорид кальция и бикарбонат натрия? К сожалению, в использованной ссылке [252] нет экспериментальных деталей.

Следующий раздел работы посвящён результатам и их обсуждению. По данному разделу имеются следующие замечания:

6. Для контроля размерности наночастиц использовались ПАВ (ПЭГ-2000 и ТВИН-20). Интересно, какое количество этих веществ входит в конечные наночастицы? Есть ли данные (ТЭМ) о характере распределения неорганической фазы в наночастицах?

7. На с. 95 говорится о масштабировании синтеза в 50 раз, но не приводятся начальный или конечный масштаб.

8. На с. 102 увеличение гидродинамического размера частиц при переносе их в фосфат-содержащие буфера связывают с изменениями в гидратной оболочке. Мне кажется, столь значительные изменения (от 300-400 нм до 600-800 нм) могут быть вызваны лишь ассоциацией наночастиц за счёт многозарядных фосфатных анионов. Уменьшение размеров в чистой воде происходит за счёт дестабилизации агрегатов при вымывании из них фосфат-анионов.

9. Данные по выживаемости клеток в присутствии новых препаратов (рис. 4.28-4.30, 4.33, 4.34, рис. 13 в автореферате) следовало бы представить в виде графиков, чтобы было наглядно видно какой концентрации соответствует 50%-ная выживаемость клеток. Из приведённых диаграмм создаётся впечатление,

что IC50 для чистого доксорубина скорее 1 чем >2 мкМ. Рис. 4.30 сложен для понимания и должен быть разбит на несколько рисунков.

10. Работа оформлена достаточно аккуратно, с минимальным количеством опечаток. Можно отметить неправильное положение таблиц в альбомной ориентации в печатной версии работы (повёрнуты на 180°). В тексте часто встречается слово "нейлон", при этом имеется в виду нейлон-6, который проще называть капроном в соответствии с русскоязычной традицией.

В целом, работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне, результаты не вызывают сомнений, что обусловливается использованием необходимого комплекса методов в области синтеза наночастиц и их модификации. Для анализа полученных продуктов использованы соответствующие методы исследований: динамическое светорассеяние, жидкостная сцинтилляция, флуориметрия, просвечивающая электронная (включая EDAX) и конфокальная микроскопия, гель-электрофорез, оптическая и ИК-спектроскопия. Изучение биологической активности новых препаратов выполнено на культурах раковых и обычных клеток. Все основные работы выполнены автором или при его непосредственном участии.

В результате проведённых исследований выработаны новые подходы к синтезу наноразмерных носителей на основе карбоната и фосфата кальция, а также кремнезёма. Разработаны методы загрузки данных носителей различными веществами - стрептавидином, красителями, олигонуклеотидами, противоопухолевым препаратом доксорубином. Создана оригинальная технология получения полых частиц из капрона при использовании неорганических наночастиц в качестве растворимых матриц. Полученные результаты имеют важное значение для создания новых терапевтических и диагностических препаратов, систем для разделения биополимеров. На мой взгляд, дальнейшее развитие исследований перспективно в направлении конструирования систем доставки лекарственных препаратов, управляемых изменением pH, а также применения капроновых нанокапсул в различных, в том числе далёких от медицины, областях науки и техники.

Отмеченные выше недостатки носят частный характер и не затрагивают существа защищаемых положений. Результаты диссертационного исследования достаточно полно отражены в 5 статьях, индексируемых базами данных WoS/Scopus. Новизна выполненных работ подтверждена патентом на

изобретение. Автореферат и публикации в полной степени отражают содержание диссертационной работы.

Таким образом, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук диссертация Поповой Виктории Константиновны "Новые способы синтеза наноматериалов карбоната кальция, диоксида кремния и их композитов как носителей биологически активных соединений" выполнена на высоком научном уровне и является завершенной научно-квалификационной работой, совокупность результатов которой может быть охарактеризована как решение важных задач в области создания новых биомедицинских препаратов. Диссертационная работа по объему, качеству выполнения, актуальности полученных результатов полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.6 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертационная работа оформлена в соответствии с Положениями о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Попова Виктория Константиновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

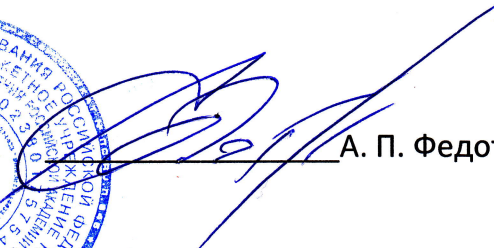
Заместитель директора по науке
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Лимнологического института Сибирского
отделения Российской академии наук
(ЛИН СО РАН), д.х.н., профессор

 В. В. Анненков
24.02.2025

664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. +7-9148982577
e-mail: annenkov@lin.irk.ru
Вадим Владимирович Анненков

Подпись Анненкова Вадима
Владимировича заверяю,
Директор ЛИН СО РАН, д.г.-м.н.



 А. П. Федотов