

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических
наук Ефремовой Марии Владимировны на тему:
«Синтез, физико-химические свойства и биомедицинское применение
гибридных материалов на основе наночастиц магнетит-золото»,
по специальностям 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)» и 03.01.04 – «Биохимия»

Диссертационная работа Марии Владимировны Ефремовой посвящена созданию гибридных наночастиц магнетит-золото со структурой типа «ядро-оболочка» и «гантель» с их последующей модификацией для доставки лекарств в клетки и ткани, визуализации опухолей и магнито-механического управления активностью иммобилизованных ферментов.

В настоящее время создание наночастиц различной структуры для диагностики злокачественных новообразований или доставки лекарственных средств представляет одно из наиболее перспективных направлений в фармакотерапии. Развитие исследований в этой области поставило новую задачу: создание систем «все-в-одном», т.е. способных и диагностировать заболевание, и доставлять лекарство, и визуализировать его высвобождение. На данный момент подобные комплексные работы в литературе отсутствуют. В диссертационной работе М. В. Ефремовой впервые получены наночастицы, обеспечивающие выполнение нескольких функций: доставка лекарства в клетки, слежение за эффективностью высвобождения препарата в опухолевой ткани, дистанционное управление активностью ферментов, иммобилизованных на поверхности частиц, с помощью внешнего магнитного поля. Таким образом, актуальность диссертационной работы Ефремовой и ее современность несомненна.

Диссертационная работа М.В. Ефремовой построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы,

экспериментальная часть с описанием материалов и методов работы, обсуждение результатов, выводы и список цитированной литературы. Диссертация изложена на 144 страницах, содержит 43 рисунка и 16 таблиц.

Во введении показана актуальность работы, сформулирована ее цель и задачи, отражены научная новизна, теоретическая и практическая ценность проведенных исследований.

В обзоре литературы диссертант рассмотрела публикации по всем аспектам, затронутым в ее экспериментальной работе. Систематизированы основные методы синтеза наночастиц магнетита и магнетит-золото со структурой «ядро-оболочка» и со структурой «гантель», разработанные в течение последних десятилетий, рассмотрено использование магнитных частиц в биомедицине, их токсичность и модификация для применения *in vivo*. В каждом разделе автор дает четкое описание метода и детально рассматривает результаты статей, опубликованных в литературе. При этом М.В. Ефремова демонстрирует способность к критическому анализу публикаций. Так, в статье Guardia et. al. (ссылка № 12) она проанализировала приведенные в приложении кривые нагрева гибридных частиц магнетит-золото и показала, что рассчитанные ею величины резко отличаются от результатов, приведенных авторами статьи.

Обращает на себя внимание значительное количество опубликованных работ, рассмотренных диссертантом (243 источника), что свидетельствует о широком знании литературы в области, выбранной для диссертационной работы.

В экспериментальной части М.В. Ефремова описала использованные в работе соединения и методы исследования. Следует отметить колоссальный объем проведенных ею исследований: налажено 14 способов синтеза наночастиц, около 20 различных методов использовано для анализа их физических, химических и биологических свойств. Следует отметить, что при выполнении диссертационной работы Ефремова М.В. широко использовала такие современные методы как атомно-эмиссионная

спектрометрия, рентгенофазовый анализ, конфокальная микроскопия, магнитно-резонансная томография и др. Такой широкий набор современных экспериментальных методов, освоенных М.В. Ефимовой, свидетельствует о высоком уровне ее профессиональной подготовки.

Глава 3 «Обсуждение результатов» содержит большой объем экспериментальных данных, полученных М.В. Ефремовой, и их обсуждение. Следует отметить строгую логику проведенных исследований - синтез наночастиц - их модификации - тестирование на клетках и лабораторных животных. Отличительной чертой является продуманность каждого этапа и тщательное сопоставление результатов, полученных разными методами, и данных литературы.

На первом этапе она получила наночастицы Fe_3O_4 , используя различные методики, описанные в литературе. Далее частицы магнетита были покрыты золотом. Анализ размера и морфологии методами просвечивающей электронной микроскопии и рентгеноспектрального микроанализа доказал образование гибридных наночастиц магнетит-золото типа «ядро-оболочка» при использовании частиц Fe_3O_4 диаметром 9 ± 2 нм.

Далее были получены 4 образца гибридных наночастиц типа «гантель» с использованием различных высококипящих растворителей. Анализ размеров, морфологии и структур полученных образцов методами просвечивающей электронной микроскопии и в режиме темного поля с высокоугловым кольцевым детектором наглядно продемонстрировал наличие отдельных частиц Fe_3O_4 и Au в составе "гантели". Впервые проведено систематическое исследование магнитных свойств этих частиц и установлено, что они усиливаются по мере увеличения размера частиц оксида железа и достигают значений объемного материала при диаметре "гантели" около 25 нм. При этом М.В. Ефремовой удалось получить гантелевидные наночастицы, превосходящие описанные в литературе по степени кристалличности. Монокристаллические наночастицы обладали суперпарамагнитными свойствами, в магнитном поле вызывали разогрев ткани и индуцировали

гибель клеток. Эти результаты свидетельствуют о целесообразности их использования *in vivo* в магнитно-резонансной томографии и магнитной гипертермии.

На следующем этапе работы М.В. Ефремова модифицировала полученные наночастицы и продемонстрировала возможности их применения в биохимии и медицине.

Золотая оболочка наночастиц типа "ядро-оболочка" была модифицирована тиол-содержащими соединениями с различной длиной углеводородной цепи и карбоксильной группой на свободном конце. Наличие последней позволила иммобилизовать α -химотрипсин на поверхности частиц. Это приводило к появлению в растворе частиц большего размера, причем, чем меньше добавляли фермента, тем больше образовывалось димерных частиц, соединенных ферментом. Обработка образцов низкочастотным магнитным полем приводило к снижению активности α -химотрипсина. При увеличении доли димеров до 64% активность снижалась до 36%. Эффект наблюдали при наличии коротких линкеров с жесткой структурой (L-цистеин, 3-меркаптопропионовая и липоевая кислоты), что указывает на подавление активности фермента вследствие механической деформации его молекул. Эти результаты М.В. Ефремовой демонстрируют возможность дистанционной регуляции активности ферментов с помощью полученных ею наночастиц.

С практической точки зрения особенно интересны результаты, полученные диссертантом на частицах магнетит-золото в форме "гантели". Для перевода в водную фазу эти наночастицы были покрыты сополимером карбоксиполиэтиленгликоля и глицерофосфолипида с двумя остатками стеариновой кислоты. В воде сополимер образовывал мицеллы, содержащие во внутренней полости наночастицы. Такая конструкция позволила разработать метод двойной модификации частиц путем введения ковалентной метки в золотую частицу и нековалентной загрузки лекарства или его флуоресцентной модели в полимерную оболочку с целью

дальнейшего применения в тераностике и/или мультимодальной визуализации. К золотым частицам присоединяли флуоресцентный краситель сульфо-Су5, содержащий S-S фрагмент, а в полимерную оболочку вводили флуоресцентный краситель Нильский красный или доксорубицин (DOX). Наличие двух меток позволяет наблюдать за распределением частиц в организме по флуоресценции ковалентно присоединенного Су5 и следить за высвобождением соединений, нековалентно связанных с частицей (нильский красный или доксорубицин). Важно, что полученные М.В. Ефремовой образцы весьма стабильны *in vitro*, нетоксичны для клеток в культуре, не вызывают образования активных форм кислорода и гемолиза эритроцитов. Такая система перспективна для диагностики и доставки лекарств *in vivo*.

При внутривенном введении полученных наночастиц в мышь анализ их распределения в тканях организма показал, что 3% от введенной дозы накапливается в опухолевой ткани (с. 119). Данная величина в три раза выше, чем средний показатель эффективности доставки в опухоль наночастиц, описанных в литературе.

Таким образом, М.В. Ефремова разработала систему на основе магнетит-золото, которая обладает высоким потенциалом для практического использования в биомедицине в качестве контрастного агента для визуализации опухоли с помощью оптической и магнитно-резонансной томографии и в качестве носителя для доставки лекарственных препаратов в опухолевую ткань.

Диссертация и автореферат хорошо оформлены. Все результаты, полученные М.В. Ефремовой, тщательно документированы первичными данными, приведенными в таблицах, на рисунках, гистограммах и фотографиях, и поэтому не вызывают сомнений в достоверности. Они получены путем проведения большого количества экспериментов с использованием современных методов и оборудования. Достоверность результатов подтверждается публикацией научных результатов диссертационной работы в 11 статьях, из них 5 опубликовано в престижных

зарубежных журналах, а также обсуждением этих результатов на 19 международных и российских конференциях.

Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

При чтении диссертации у меня возникли следующие вопросы:

1. Каким образом Вам удалось синтезировать наночастицы монокристаллической структуры?

2. Почему в частицах димера под действием переменного магнитного поля возникают вращательные моменты, направленные противоположно (рис. 34, схема)?

Замечания

1. Не приведены сведения о структуре частиц, получившихся в результате обработки $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ тиол-содержащими соединениями и сополимером карбоксиполиэтиленгликоля и дистеароил-глицерофосфолипида (стр. 85). Между тем данные о количестве, например, карбоксильных групп, были бы полезны для анализа связывания доксорубина.

2. Магнитно-резонансная томография с использованием наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в качестве контрастных агентов *in vivo* выявила их накопление в опухолях мышей (рис. 43). Однако данные, приведенные на рис. 41, отчетливо демонстрируют накопление наночастиц в сосудах, окружающих опухоль, но не в раковых клетках самой опухоли. Нильский красный, использованный как модель лекарства, диффундирует из частиц, но не в сторону опухоли (рис. 42 Б). Представляется целесообразным в дальнейшей работе провести аналогичные опыты с доксорубином, исследовать его локализацию в диспергированных клетках опухоли и влияние на ее размер.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к

работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (по химическим наукам)» и 03.01.04 – «Биохимия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертация и автореферат оформлены согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Мария Владимировна Ефремова заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» и 03.01.04 – «Биохимия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

ГРОЗДОВА Ирина Дмитриевна

27 сентября 2018 г

Контактные данные:

тел.: +7(495)939 31 14, e-mail: grozdova@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация: 03.00.04 - биохимия

Адрес места работы:

119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, строение 3.

Подпись д.б.н., в.н.с. И.Д. Гроздовой удостоверяю:

