

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертацию  
на соискание ученой степени кандидата химических наук

**РОМАНЮКА АНДРЕЯ ВЛАДИМИРОВИЧА**

**на тему: «Полимерные нанореакторы на основе полиоксалата: получение,  
свойства и биомедицинское применение»**

по специальностям 02.00.06 — «высокомолекулярные соединения, химические науки», 03.01.04 — «биохимия, химические науки».

Разработка новых эффективных путей борьбы с онкологическими заболеваниями до сих пор остаётся актуальнейшей, хотя и чрезвычайно сложной задачей, объединяющей усилия специалистов разных профилей в различных странах. Одним из наиболее успешных подходов показала себя фотодинамическая терапия злокачественных опухолей. Однако, существенным принципиальным ограничением метода является низкая проницаемость биологических тканей для возбуждающего света. В рецензируемой работе А.В. Романюк предлагает принципиально иной подход к решению этой проблемы, а именно: генерировать возбуждение фотосенсибилизаторов непосредственно в раковых клетках без участия внешнего источника света. Для этого предложено использовать пероксиоксалатную реакцию, сопровождающуюся хемилюминесценцией, способной в принципе инициировать образование синглетного кислорода, токсичного для клеток. Практическая реализация этой оригинальной идеи требует выполнения следующих принципиально важных условий. 1) Наличие в клетках-мишенях достаточного количества пероксида водорода, что, по данным литературы, как раз характерно для раковых клеток. Это также делает проблему адресной доставки препарата не столь критичной. 2) Доставка в раковые клетки оксалатов в мономерной или полимерной форме и активатора. Для этой цели автор предлагает использовать концепцию полимерных нанореакторов, которые должны обеспечить солюбилизацию компонентов реакции в кровотоке, их защиту от биodeградации (гидролиза оксалатов) и транспорт в клетки-мишени. Из сказанного следует, что поставленная в работе А.В. Романюка амбициозная задача

является оригинальной и весьма актуальной, требует междисциплинарного подхода с использованием объектов и методов как полимерной химии, так и биохимии. Последнее полностью обосновывает представление диссертации по двум указанным специальностям, а её решение позволяет рассматривать работу как пионерскую, вносящую важный вклад в решение проблемы борьбы с онкологическими заболеваниями.

Работа построена традиционным образом. Она включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

В обзоре литературы Романюк А.В. в соответствии с поставленной целью проанализировал существующие типы полимерных нанореакторов. В основу классификации нанореакторов было положено их строение. В приведённых примерах описана роль гетерогенности на микро- или нано уровне и локального окружения, обусловленного природой реактора, для различных реакций. На основании проведенного анализа автор приходит к выводу, что в наибольшей мере цели работы отвечают частицы типа «ядро-оболочка», а именно мицеллы и эмульсии. В связи с этим отдельная глава обзора литературы посвящена амфифильным полимерам, которые могут быть использованы для формирования таких структур, с особым акцентом на блок-сополимерах пропиленоксида и этиленоксида, которые активно используются в работе.

Предлагаемый в работе подход основан на возбуждении фотосенсибилизатора с последующим образованием синглетного кислорода. Эти вопросы рассмотрены в отдельной главе обзора литературы. Кроме этого, в ней уделяется внимание использованию полимерных носителей в фотодинамической терапии. Способы детектирования синглетного кислорода описаны очень подробно, даже несколько избыточно, учитывая, что в работе реализован только один подход с участием ловушки SOSG, флуоресценция которой возрастает при окислении синглетным кислородом.

Изложение биохимических основ рецензируемой работы выделено в отдельную главу, в которой объясняется происхождение перекиси водорода в



живых клетках, причины её повышенной концентрации при раке, так называемый окислительный стресс, а также важность подхода, предлагаемого в работе, в контексте современных представлений о метаболизме раковых клеток. Здесь же автор классифицировал и описал различные методы определения активных форм кислорода в биологических объектах, уделив особое внимание ловушкам, и в последствии применил одну из них для анализа активных форм кислорода внутри клеток и во внешней среде.

В заключительной главе обзора литературы производится сопоставление различных хемилюминесцентных реакций, из которого становится понятен выбор диссертантом пероксиоксалатной реакции как основы для изучаемых систем, а также произведен критический обзор полимерных нанореакторов для её использования в биологических системах и водных растворах.

В целом обзор литературы очень объемный, однако это оправдано широким кругом задач, которые приходилось решать диссертанту для реализации идеи работы. Некоторая избыточность изложения компенсируется структурированностью материала с использованием обобщающих схем и таблиц. Также положительной чертой обзора является подытоживание его разделов с обсуждением того, какие выводы были сделаны автором в контексте решения задач диссертации.

Глава диссертации, посвященная методикам эксперимента, изложена достаточно подробно и тщательно. Она является довольно объёмной, что соответствует большому числу использованных методов, включая синтетические, физико-химические методы, методы работы с клетками в культуре. Каждая методика написана настолько подробно, что ее можно легко воспроизвести. Отдельное внимание уделено проблеме осушки растворителей, т.к. первая часть работы связана с использованием высокоактивных оксалатов, которые легко гидролизуются в присутствии следов воды.

Глава, посвященная обсуждению полученных результатов, состоит из двух основных частей. В первой части изучены хемилюминесцентные системы на основе низкомолекулярных оксалатов, роль нанореактора для которых выполняли

мицеллы и ассоциаты полимеров. В работе исследованы ассоциаты трёх амфифильных три-блок сополимеров семейства плуроников, причем в их ряду закономерно варьируется длина гидрофильного блока полиэтиленгликоля при постоянной длине гидрофобного блока полипропиленгликоля. С ростом гидрофобности полимера увеличивается размер ассоциатов, образуемых им в водном растворе. Одновременно возрастает количество света, испускаемого в ходе реакции инкапсулированного оксалата с перекисью водорода. Тенденция подтверждается изучением системы на основе чередующегося сополимера диметилосан-этиленоксид, который также образует крупные ассоциаты, что повышает эффективность испускания света. Удачной выглядит попытка объяснить наблюдаемый эффект за счёт оценки степени солюбилизации низкомолекулярных оксалатов в ассоциатах плуроников на основе эмпирических корреляций. Описанные системы демонстрируют закономерность, однако не могут непосредственно использоваться для реализации идеи работы, т.к. полимерные мицеллы не обеспечивают стабильности оксалатов в водной среде. Диссертант отказывается от дальнейшего изучения подобных систем, хотя выглядит целесообразным исследование других блок-сополимеров, которые могли бы обеспечить формирование оптимального гидрофобного ядра нанореакторов.

Трудности с низкомолекулярными оксалатами явились причиной к переходу к олигомерным и полимерным оксалатам во второй части работы. Существенным достижением является получение узких фракций полиоксалата методом препаративной гель-проникающей хроматографии высокого давления. Результат первой части лёг в основу создания эмульсий диметилфталата, стабилизированных плуроником L64, и имеющих размер, сопоставимый с крупными полимерными ассоциатами, описанными в качестве нанореакторов в первой части работы.

Автором проведена тщательная оптимизация состава нанореакторов с точки зрения эффективности хемилюминесцентной реакции и подобран состав, который отвечает наиболее высокой эффективности протекания целевой реакции.



Показано, что в таких нанореакторах полиоксалат проявляет существенно более высокую стабильность, чем в мицеллах, полученных через раствор полиоксалата в тетрагидрофуране. Автором впервые исследовано влияние молекулярной массы полиоксалата на эффективность испускания света в ходе реакции с перекисью водорода и его стабильность по отношению к гидролизу.

Результаты экспериментов на клетках коррелируют с результатами, полученными на модельных бесклеточных системах и убедительно доказывают состоятельность подхода, который был апробирован в данной работе.

В конце работы автор делает попытку дополнительно усилить накопление нанореакторов в клетках за счет придания отрицательно заряженным исходным нанореакторам положительного заряда. При добавлении поликатиона (поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилата) заряд частиц уменьшается и становится положительным, причем снижение эффективности хемилюминесценции с ростом содержания поликатиона в системе несколько «отстает» от снижения отрицательного заряда. Оказалось, что возможно получить частицы, имеющие небольшой положительный заряд, но при этом способные реагировать с перекисью водорода с испусканием света. Тестирование таких конструкций на клетках выявило их чрезвычайно высокую эффективность. Таким образом показано, что образование положительно заряженных комплексов поликатиона с эмульсионными нанореакторами является дополнительным инструментом, способным увеличить эффективность разрабатываемого в работе подхода.

Оценивая работу А.В. Романюка в целом можно констатировать, что она представляет собой оригинальное по замыслу и большое по объёму комплексное исследование, в ходе которого автор в целом выполнил поставленную задачу, а именно, он продемонстрировал принципиальную возможность избирательного уничтожения раковых клеток с использованием принципов фотодинамической терапии без внешнего фотовозбуждения, а за счёт хемилюминесцентной реакции с участием биогенной внутриклеточной перекиси водорода. Я считаю это крупным достижением автора, имеющим большое научное и прикладное значение.

Тем не менее, по работе можно сделать некоторые замечания:

1) В качестве основного нанореактора для осуществления ПО-реакции в том числе и в опухолевых клетках А.В. Романюк использует эмульсии диметилфталата в водной среде, стабилизированные плуроником L64. Однако, остаётся неясным почему эмульсия имеет стабильное бимодальное распределение по размеру капель, какова весовая и числовая доля крупных капель ( $400 \pm 100$  нм) и роль каждой фракции в доставке реагентов ПО-реакции в клетки. Неясен также механизм проникновения этих жидких капель в клетки и их судьба внутри клеток.

2) В качестве ключевого участника ПО-реакции автор использует полимерные оксалаты и, в частности, изучает их гидролиз. Однако, механизм гидролиза остаётся нераскрытым. В частности, остаётся неясно, что автор принимает за константу скорости гидролиза и на чём основано утверждение автора, что «константа скорости гидролиза полиоксалатов уменьшается на два порядка с ростом их молекулярной массы».

3) Одним из важных положений работы является утверждение, что из-за существенных различий в количествах биогенной  $H_2O_2$  в раковых клетках по сравнению с «нормальными» клетками ПО-реакция должна наблюдаться только в первых, но не во вторых. Однако, экспериментальных данных по взаимодействию «нормальных» клеток с эмульсией («негативный контроль») в работе не приводится.

4) Изучение стабильности полимер-коллоидных комплексов методом лазерного микроэлектрофореза обнаружило постоянство электрокинетического потенциала во времени. Насколько достоверным является этот результат, принимая во внимание постоянный гидролиз полиоксалата и увеличение числа отрицательных зарядов в системе?

Приведенные замечания не снижают научной ценности и не умаляют значимости представленной работы, а носят характер пожеланий и предложений по ее дальнейшему развитию. Степень обоснованности и достоверности выводов, научных положений и рекомендаций, а также достоверность результатов не подвергаются сомнению, учитывая грамотную постановку экспериментов и



исследования в целом и глубокий анализ литературы. Это также подтверждается публикацией материалов диссертации в 3 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, в том числе 1 статья в изданиях из перечня, рекомендованных Минобрнауки РФ, многократно докладывались на российских и международных научных конференциях. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Кандидатская диссертация Романюка А.В. является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для химии высокомолекулярных соединений, а именно: показано, что оксалаты полимерного строения на порядок более эффективны в пероксиоксалатной реакции, чем их низкомолекулярные аналоги, при проведении реакции в эмульсионных нанореакторах, а также, что крупные полимерные ассоциаты, используемые в качестве нанореакторов, повышают эффективность пероксиоксалатной реакции, проводимой в водной среде.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.06 — «Высокомолекулярные соединения» (химические науки) по областям исследования: п. 9 «Целенаправленная разработка полимерных материалов с новыми функциями и интеллектуальных структур с их применением, обладающих характеристиками, определяющими области их использования в заинтересованных отраслях науки и техники», а также п. 5 «Анализ и синтез биологически активных веществ, выяснение их физиологического действия и возможностей применения полученных веществ в медицине и других отраслях народного хозяйства» и п. 14 в части «Изучение роли активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления и свободнорадикальных продуктов в нарушениях и регулировании метаболических процессов в биосистемах» паспорта специальности 03.01.04 — «Биохимия» (химические науки). Диссертация Романюка А.В. по актуальности избранной темы, сформулированных в работе степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверности и новизне отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени

