

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора физико-математических наук Кочубея Вячеслава Ивановича на диссертационную работу Шанвар Самах «Влияние покрытия альбумином на долговременную коллоидную стабильность и цитотоксичность антистоксовых нанофосфоров», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — Биофизика

Актуальность темы исследования.

По данным ScienceDirect одним из наиболее динамично развивающихся направлений исследований в области нанотехнологий является изучение использования наночастиц и наноструктур для адресной доставки лекарственных веществ. Это обусловлено возможностью варьирования нагрузки наночастиц терапевтическим агентом, создания условий для адресной доставки и высвобождения. Использование для этой цели люминесцирующих наночастиц дополнительно позволяет осуществлять визуальный контроль доставки и накопления разработанных препаратов в заданной области. Антистоксовые (апконверсионные) нанофосфоры имеют ряд преимуществ перед другими люминесцирующими наночастицами вследствие ряда преимуществ, облегчающих визуализацию – использование для визуализации и возбуждения спектральной области прозрачности биологических тканей, отсутствия автофлуоресценции биотканей и других особенностей.

Однако, по своей природе, апконверсионные наночастицы не являются биосовместимыми, как минимум, вследствие своей гидрофильности. Поэтому, при введении наночастиц с немодифицированной поверхностью в живой организм, естественной реакцией организма будет их отторжение путем ряда биохимических реакций и последующее выведение из организма. Соответственно, для подавления такой реакции организма и эффективной доставки и терапевтического воздействия, необходимо придание наночастицами таких свойств, как биосовместимость, невидимость для иммунной системы, отсутствие агрегации в биологических жидкостях.

Такие свойства могут придаваться наночастицам путем создания на них биосовместимой гидрофильной оболочки, позволяющей дополнительно

осуществлять нагрузку наночастиц терапевтическими и адресными молекулами. Одним из типов такой оболочки и является белковая корона, создание и свойства которой исследованы в диссертации.

Таким образом, разработка методик создания белковой оболочки (короны) на поверхности апконверсионных наночастиц и исследование взаимодействия таких наночастиц с биологическими объектами несомненно является актуальным как с практической точки зрения – для создания терапевтических агентов, так и с теоретической – для выявления процессов, происходящих при взаимодействии созданных комплексов с живыми объектами. Это исследование открывает новые возможности для моделирования биофизических процессов, включая сорбцию биополимеров на поверхность неорганических материалов, протеин-опосредованную агрегацию наночастиц и др.

Достоверность результатов подтверждается логичным выбором и использованием современных методов исследования и согласованностью полученных результатов с литературными данными. Основные положения диссертации опубликованы в ведущих международных и российских журналах, докладывались на многочисленных российских и международных конференциях, обсуждались на различных семинарах.

Научная новизна результатов.

Автором впервые показано, что белковая корона из термически денатурированного БСА (дБСА) обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА. Показано различие в дисперсности наночастиц, осажденных различными методами и повторно суспензированных.

Впервые исследован образование стабильной белковой короны на поверхности апконверсионных наночастиц при различных концентрациях белка, приведены оптимальные концентрации БСА и дБСА для образования стабильной белковой короны.

Показано, что лиофилизация наночастиц, покрытых альбумином, позволяет сохранять их стабильность при их последующей солубилизации в различных растворителях, в том числе в присутствии белков сыворотки.

Показано взаимодействие белковой короны из дБСА с белками сыворотки: такое покрытие позволяет сохранить размер и коллоидную устойчивость комплексов наночастица – белковая корона.

Научная и практическая значимость диссертации.

Разработанная методика последовательного создания гидрофильной оболочки поверхности апконверсионных наночастиц позволяет создать наноконструкции, перспективные для использования в биологии и медицине. Проведенные исследования условий формирования белковой короны дают представление о влиянии различных факторов на данный процесс и позволят целенаправленную разработку технологий получения стабилизированных белком наночастиц для биомедицинских применений. Полученные данные о предпочтении методов лиофилизации наноконструкций перед другими методами создания нанолекарств с возможностью хранения и последующего использования представляются перспективной основой для создания терапевтических агентов.

Общая характеристика работы.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы и приложения. Общий объем составляет 114 страниц, включая 46 рисунков и 6 таблиц. Список литературы содержит 117 источников.

Во Введении обосновывается актуальность темы диссертации, определяются цели и задачи исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, приводится краткое содержание глав и результаты апробации исследования, формулируются положения, выносимые на защиту.

В первой главе, на основе литературных данных, рассмотрены свойства апконверсионных наночастиц, их использование в биологии и медицине. Показано взаимодействие наночастиц с живыми объектами, их интернализация и пути выведения из организма. Рассмотрены как физико-химические свойства альбумина и его использование для стабилизации наночастиц, так и методы создания белковой короны и ее свойства.

Во второй главе описаны используемые методы синтеза наночастиц и наноконструкций, их характеристики. Подробно описаны используемое оборудование и методы исследований для решения поставленных задач. Следует отметить, что глава очень разумно структурирована – по каждой задаче представлены пути ее решения в виде наглядных схем, используемые методики синтеза, обработки нанолекарств, их исследования и анализа полученных результатов.

В третьей главе автором приведены, собственно, результаты исследований. Подробно рассмотрены:

- синтез наночастиц, создание на их поверхности гидрофильных оболочек и последующее покрытие белковой короной;
- исследования по определению оптимальной концентрации белковой короны как из нативного, так и денатурированного альбумина и различие свойств короны в зависимости от типа гидрофильного покрытия наночастиц;
- исследования по коллоидной стабильности ресуспензированных наночастиц, предварительно осажденных центрифугированием или лиофилизацией;
- анализ цитотоксичности полученных наноконплексов.

В заключении представлены полученные результаты и их роль в исследованиях в области разработки терапевтических наноконплексов.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность результатов работы обуславливается применением надежных и хорошо апробированных методов, а также верификацией полученных численных результатов в ходе лабораторных экспериментов. Диссертационная работа Шанвар Самах представляет целостное исследование. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в работе Шанвар Самах, являются обоснованными. Новизна научных положений не вызывает сомнений.

Публикации, отражающие основное содержание диссертации.

По материалам диссертации опубликованы 13 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах из списка рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в базах Web of Science и Scopus, 8 статей в сборниках конференций. **Автореферат** и опубликованные работы достаточно полно отражают основное содержание диссертации и характеризуют результаты проведенных исследований.

Замечания по работе.

Представленная работа выполнена на высоком научном уровне. В то же время имеются некоторые замечания. Следует отметить, что, в основном, эти замечания сводятся к неудачным или неполным формулировкам.

Формулировка задачи 2: «Исследовать долговременную коллоидную стабильность НАФ, покрытых тетрафторборатом нитрозония (НАФ-NOBF 4) и белковой короной из дБСА в различных буферах и биологических средах.» - исходя из текста диссертации, на момент постановки задачи непонятно, зачем нужно данное покрытие

Формулировка новизны: «Предложена новая методика стабилизации НАФ-NOBF 4 с помощью покрытия альбумином и лиофилизации, позволяющая получать комплексы,

сохраняющие стабильность при их последующей солюбилизации в различных растворителях, в том числе в присутствии белков сыворотки.» - желательно было указать, что это за комплексы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Белковая корона из термически денатурированного БСА обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА. – опять же неудачная формулировка: с БСА, или с наночастицами, покрытыми БСА?

2. Для получения стабильных комплексов необходимо определение оптимальной концентрации белка в процессе образования белковой короны. – для нормального восприятия формулировки необходимо указать, что за комплексы.

3. Проведение лиофилизации после формирования белковой короны из дБСА на поверхности наночастиц позволяет получать стабильные комплексы, устойчивые в сложных биологических средах. – непонятно, откуда взялось выражение «сложные биологические среды», и что такое сложная среда по сравнению с простой.

В работе достаточно подробно говорится о выводе наночастиц из организма и необходимости их биоразлагаемости, однако апконверсионные наночастицы не являются биоразлагаемыми. Соответственно, фагоцитоз не может разрушить апконверсионные наночастицы (стр. 38).

Приведенная в диссертации оптимальная концентрация белка, на самом деле, определена для заданной концентрации наночастиц. Есть большая вероятность того, что изменение концентрации наночастиц влечет за собой изменение оптимальной концентрации альбумина.

Неудачна таблица 1. Использование таблицы подразумевает наличие параллелей. Например: материал-состав, поверхность — длительность экспозиции. На самом деле этих параллелей нет.

Для исследования цитотоксичности выбраны клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3. Однако известно, что цитотоксичность апконверсионных наночастиц для разных типов клеток различается на порядки. Формулировка «Эта клеточная линия была выбрана как возможная модель будущих исследования действия тераностических комплексов на основе НАФ» недостаточна.

Представляет интерес не только сохранение растворимости лиофилизированных наночастиц при хранении, но и влияние хранения на цитотоксичность наночастиц. Из текста диссертации неясно, проводились ли исследования сохранения все свойств наночастиц в процессе их длительного хранения и последующего растворения.

Встречается также ряд грамматических ошибок, например:

Фраза на стр. 25 - «Оболочка должна генерировать энергию и пространственный барьер...» - непонятно, что понимается под генерацией пространственного барьера?

Стр. 19 «Эти электронные переходы с участием ионных оболочек 4f имеют более одного метастабильного уровня, которые являются запрещенными правилами квантово-механического отбора» - переход не может «иметь уровень», а уровень не может быть запрещенным.

Фразы на Стр. 35 - «гидратная оболочка вокруг наночастиц смещается». Куда и откуда смещается? Там же: «увеличить растворимость наночастиц». Наночастицы не растворяются.

«НАФ способны к селективной апконверсии длины волны (или цвета), такой как преобразование ближний ИК в более короткий ближний ИК, видимый (синий, зеленый, красный) или даже УФ.» «Эмиссионные цвета наноматериалов» - что это такое?

Тем не менее, указанные замечания не снижают общую высокую оценку диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа Шанвар Самах «Влияние покрытия альбумином на долговременную коллоидную стабильность и цитотоксичность антистоксовых нанофосфоров» удовлетворяет требованиям ВАК, предъявляемых к кандидатским диссертациям в пп.9-11,13,14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемых к кандидатским диссертациям, а ее автор Шанвар Самах заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 — Биофизика

Официальный оппонент:

профессор кафедры оптики и биофотоники Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского. 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83

Доктор физико-математических наук _____ Кочубей Вячеслав Иванович
Тел. +7 (8452) 21-07-2, e-mail: saratov_gu@mail.ru

