

ОТЗЫВ

официального оппонента 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 избранной темы

Оптические технологии клеточной визуализации становятся все более востребованным инструментом для получения данных о структуре и функционировании биологических объектов. Наиболее широкое применение данное направление нашло в области доклинических экспериментальных исследований для разработки новых методов диагностики патологических процессов, исследования механизмов прогрессирования заболеваний, оценки эффективности и выявления механизмов действия терапевтических препаратов, исследования их фармакокинетики, фармакодинамики и токсичности, разработки новых контрастирующих (диагностических) агентов для дальнейшего клинического использования. Одним из наиболее быстро развивающихся направлений является разработка контрастирующих агентов на основе наночастиц различной природы с управляемыми оптическими свойствами, а также методов их применения для структурной и функциональной визуализации. Среди них соединения, обладающие способностью к антистоксовой люминесценции (антистоксовые нанофосфоры, НАФ) представляются оптимальными кандидатами на роль контрастирующих агентов для *in vivo* исследований. Это связано с тем, что регистрация люминесценции НАФ осуществляется в более коротковолновой области спектра по сравнению с ее возбуждением, обеспечивая отсутствие влияния собственной флуоресценции тканей. Кроме того, полосы возбуждения и эмиссии таких наночастиц лежат в инфракрасной области спектра, что позволяет осуществлять исследование тканей, расположенных глубоко под поверхностью. Большинство современных работ, посвященных повышению эффективности диагностики с использованием наночастиц, направлены на синтез новых наноагентов, изучению их физических свойств, улучшению биосовместимости, разработке новых протоколов *in vitro* и *in vivo* применения, мониторингу их распределения и воздействия на клетки и организм в целом. В данном ключе актуальность диссертационной работы С. Шанвар, посвященной влиянию различных видов покрытий антистоксовых нанофосфоров на основе альбумина (белковая корона) на их

долговременную стабильность, взаимодействие с белковыми компонентами окружающей среды, связывание с клетками и *in vitro* цитотоксичность, не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа выполнена с использованием общепринятых научных методов. Основные результаты исследований подтверждены корректным анализом полученного набора данных. Результаты работы широко обсуждались на ряде конференций и прошли рецензирование в российских и зарубежных журналах. Сформулированные положения и выводы отражают основные результаты исследования и не противоречат работам других авторов по данной тематике.

Достоверность и новизна исследования

Достоверность диссертационной работы определяется достаточным объемом используемого материала, повторяемостью результатов в нескольких независимых экспериментах, анализом данных с привлечением стандартных методов биомедицинской статистики.

Новизна работы заключается в том, что автором впервые продемонстрированы преимущества покрытия нанофосфоров термически денатурированным бычьим сывороточным альбумином (дБСА) по сравнению с нативным БСА в обеспечении дисперсности коллоидов. В новом исследовании зависимости образования стабильной белковой короны на НАФ-NOBF₄ от концентрации белка определены оптимальные концентрации БСА (100 мкМ) и дБСА (10 мкМ). Автором экспериментально доказано, что данные концентрации позволяют получать равномерно покрытые альбумином нанофосфоры, избегая как агрегации наночастиц, так и избытка альбумина в суспензии.

Автором предложена новая методика стабилизации НАФ-NOBF₄ с помощью покрытия альбумином и лиофилизации, позволяющая получать комплексы, сохраняющие коллоидную устойчивость при их последующей солубилизации в различных растворителях, в том числе в присутствии белков сыворотки. Автором впервые показано, что исходно сформированная белковая корона из дБСА на поверхности НАФ-NOBF₄ снижает дальнейшую нежелательную адсорбцию белков сыворотки и позволяет сохранить размер и коллоидную устойчивость комплексов. В ходе экспериментальной апробации методики автором доказано, что после покрытия белком НАФ-NOBF₄

сохраняют спектральные свойства, а после лиофилизации и кратковременного или длительного хранения не теряют стабильности в деионизированной воде, PBS и культуральных средах DMEM и McCoy's 5A с FBS. При этом покрытие НАФ-NOBF₄ с дБСА позволяет избежать связывания с белками при инкубации с белок-содержащими средами по сравнению с НАФ-NOBF₄ без альбуминового покрытия, что демонстрирует перспективность дальнейшего использования разработанных наноагентов в качестве люминесцентных маркеров в *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

Значимость результатов для науки и практики

Результаты работы могут быть востребованы в таких областях науки как клеточная биология, экспериментальная медицина, фармакология, оптическая диагностика и нанобиотехнологии. Изучение изменений свойств наночастиц в зависимости от природы покрывающих их соединений важно для понимания механизмов взаимодействия с биологическими средами и биораспределения в организме. Практическая значимость обусловлена возможностью применения разработанных наноагентов и методик их стабилизации в биомедицинских исследованиях для разработки новых подходов в маркировании клеток и тканей.

Характеристика основного содержания диссертации

Диссертационная работа С. Шанвар содержит введение, три главы, заключение, выводы и список литературы. Общий объем диссертации составляет 114 страниц, включая 46 рисунков и 6 таблиц. Список литературы представлен 117 источниками.

Глава 1, включающая обзор литературы, посвящена анализу и обобщению современных данных по тематике антистоксовых наночастиц для биомедицинских применений и формированию белкового покрытия как одного из способов их стабилизации. Автором дано описание механизмов антистоксовой люминесценции, а также структуры, оптических свойств и областей применения известных нанофосфоров. Приведены данные о взаимодействии наноагентов с различными компонентами биологических сред, их биораспределении, путях проникновения в клетки и выведения из организма. Описаны свойства и способы применения альбумина в качестве агента для предварительного покрытия наночастиц с целью предотвращения нежелательного взаимодействия с белками в биологических средах при попадании в организм.

В Главе 2 приведено описание использованных в работе материалов и методов. В

работе для синтеза, модификации и изучения свойств нанофосфоров использован комплекс современных химических, биофизических и культуральных методов. Даны характеристики НАФ с различными вариантами поверхностной модификации, приведено описание способов осаждения наноконплексов для длительного хранения и количественного определения белковой короны. *In vitro* работы проведены на линиях нормальных и опухолевых клеток. Автором использовано современное оборудование для просвечивающей электронной микроскопии, анализа размеров частиц с помощью динамического рассеяния света, FTIR спектроскопии, флуоресцентной микроскопии. Методы исследования адекватны поставленным задачам.

Глава 3 посвящена полученным в ходе диссертационной работы собственным результатам. На первом этапе исследования автор дает характеристику синтезированным НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄ по критериям спектральных свойств, размера, полидисперсности, дзета-потенциала, структурного состава поверхности. Далее представлены результаты сравнительного анализа связывания НАФ с покрытиями ПЭИ и ПАК с поверхностью клеток СНО как самостоятельно, так и после прединкубации с культуральной средой и сделан вывод о большей эффективности связывания НАФ, покрытых белковой короной. Следующим шагом работы было изучение концентрационной зависимости формирования стабильной белковой короны из БСА и дБСА на поверхности НАФ-ПЭИ и НАФ-NOBF₄, по результатам которого автором были выявлены оптимальные концентрации альбумина, не вызывающие агрегации наночастиц и присутствия избытка несвязанного белка.

В дальнейшем было проведено сравнение коллоидной стабильности НАФ-NOBF₄ с альбуминовым покрытием при разных способах их осаждения и выбрана методика лиофилизации. Показано, что лиофилизированные дБСА-НАФ-NOBF₄ сохраняют спектральные свойства, а при ресуспендировании в воде, буферном растворе и средах для культивирования клеток, сохраняют коллоидную стабильность. Продемонстрировано, что такой подход позволяет осуществлять долговременное (по крайней мере в течение года) хранение наночастиц, покрытых дБСА. Важным этапом работы является экспериментальная проверка влияния предварительного покрытия НАФ-NOBF₄ денатурированным БСА на последующее связывание с белками. Автором показано, что покрытие альбумином снижает адсорбцию белков на наночастицах при их инкубации с культуральными средами по сравнению с наночастицами без такого покрытия.

Завершающим этапом работы было исследование цитотоксичности лиофилизированных наночастиц в отношении клеток линии SKOV-3, не показавшее статистически значимых изменений жизнеспособности клеток при инкубации с НАФ-NOBF₄ независимо от их предварительного покрытия дБСА и последующего формирования белковой короны в среде.

Замечания и вопросы

В оборе литературы детально описаны способы формирования белковой короны из альбумина как способа повышения стабильности НАФ. Другим распространенным способом стабилизирующего покрытия наночастиц уделено недостаточно внимания. При этом для понимания сделанного автором выбора в сторону альбумина было бы важно определить преимущества и недостатки различных вариантов покрытий по сравнению с ним.

Размер НАФ, покрытых NOBF₄, в деионизированной воде значительно превышает размер НАФ, покрытых олеиновой кислотой в гексане (раздел 3.1). Нужно пояснить, с чем связано подобное изменение диаметра наночастиц, учитывая малый размер молекул NOBF₄. Как объясняется снижение интенсивности эмиссии фотолюминесценции НАФ после их покрытия молекулами NOBF₄?

По результатам, изложенным в разделе 3.3, в частности, определена оптимальная концентрация термически денатурированного БСА для формирования стабильного покрытия частиц НАФ-NOBF₄ – 10 мкМ. При этом абсолютное значение дзета-потенциала полученных комплексов составляет менее 25 мВ. Может ли это повлиять на устойчивость комплексов к агрегации, особенно в присутствии в суспензии белков сыворотки?

Изложенные замечания не являются принципиальными и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Заключение

Диссертационная работа Шанвар Самах «Влияние покрытия альбумином на долговременную коллоидную стабильность и цитотоксичность антистоксовых нанофосфоров» содержит новые решения в части разработки методов стабилизации наночастиц с помощью покрытия альбумином и лиофилизации для дальнейшего их использования в биомедицинских исследованиях для контрастирования различных

структур клеток и тканей. Работа характеризуется значительной научной новизной, ее результаты достоверны и имеют перспективы практического применения. Основные результаты работы опубликованы и неоднократно представлялись автором в рамках участия в конференциях. Работа написана доступным и понятным языком, прекрасно иллюстрирована схемами и рисунками, хорошо структурирована. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, а ее автор, Шанвар Самах, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - «Биофизика».

Официальный оппонент:
Старший научный сотрудник
Отдела радиофизических методов
в медицине ИПФ РАН,
кандидат биологических наук

Анна Геннадьевна Орлова

Подпись Орловой Анны Геннадьевны заверяю
Ученый секретарь ИПФ РАН,
кандидат физико-математических наук



Игорь Валерьевич Корюкин

03.06.2021

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики Российской академии наук» (ИПФ РАН)

Адрес: 603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46.

Телефон: +7 (831) 416 4804

E-mail: ag.orlova@mail.ru, anna@ipfran.ru