

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**МАКСИМОВОЙ ЕКАТЕРИНЫ ДМИТРИЕВНЫ «Катионные наногели: синтез, свойства и использование для транспорта нуклеиновых кислот в живые клетки»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям  
02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки,  
03.01.04 – биохимия, химические науки.

Рецензируемая работа посвящена исследованию взаимодействия катионных наногелей с противоположно заряженными полиэлектролитами. Полиэлектролитные реакции данного типа были подробно исследованы ранее на макроскопических системах, однако уменьшение размеров до наномасштабного может придавать существенные особенности интерполиэлектролитным реакциям, связанные в основном с коллоидным состоянием таких систем. В частности, трудно предсказать, как будет влиять степень сшивки наногелей на их агрегацию под действием противоположно заряженных полиэлектролитов. В литературе этот вопрос систематически не исследовался, поэтому рецензируемая работа представляется актуальной. Прикладной аспект данной работы, связанный с доставкой нуклеиновых кислот в живые клетки, также относится к весьма активно разрабатываемой области применения синтетических полиэлектролитов в биомедицинской области.

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

В хорошо написанном литературном обзоре Максимова Е.Д., в соответствии с поставленной целью, проанализировала существующие подходы к синтезу микро- и наногелей. Предложенная в этой части классификация описанных в литературе подходов к синтезу наногелей основана на способах пространственного ограничения процесса, приводящего к формированию сшитых частиц заданного размера. Анализ литературы позволил диссертанту сравнить описанные подходы по таким признакам, как размер получаемых частиц, ширина их распределения по размерам, простота синтеза и т.д. На основании проведенного анализа автор приходит к выводу, что в наибольшей мере выбранным критериям отвечает подход, основанный на микроэмульсионной полимеризации внутри водной полости обращенных мицелл ПАВ в органическом растворителе. Однако ни одна из описанных в литературе методик микроэмульсионной полимеризации не может быть использована для синтеза катионных гидрогелей с размером порядка нескольких десятков нанометров. Именно поэтому в работе разрабатывается подход, основанный на выбор

полиэтокселированного олеинового спирта Бридж-О10 в качестве ПАВ, который образует в определенных условиях обращенно-мицеллярную систему.

Большое, даже несколько избыточное, внимание уделено автором потенциальным областям применения наногелей. Наконец, в заключительном разделе обзора литературы подробно описаны этапы и биологические механизмы доставки генного материала внутрь живых клеток, а также сформулированы требования к поликатионному носителю, способному с наибольшей эффективностью обеспечивать транспорт ДНК в клетки.

Глава диссертации, посвященная методикам эксперимента, изложена достаточно подробно и тщательно. В каждом разделе описан принцип, на котором основан данный метод, после чего идет подробное описание экспериментального протокола. Каждая методика написана настолько подробно, что ее можно воспроизвести в любой лаборатории.

Глава, посвященная обсуждению полученных результатов, начинается с экспериментов по синтезу наногелей. Помещая водный раствор мономеров и инициатора в систему обращенных мицелл, диссертант получает микрореактор, ограничивающий рост полимерного геля. Проведение реакции в полости обращенной мицеллы дает возможность контролировать исходный размер образующихся частиц, однако, как ни странно, гидродинамический размер получающихся частиц значительно превышает размеры самого мицеллярного микрореактора. Это очень неожиданный результат, который автор логично поясняет вторичным набуханием частиц наногелей.

Отработав методику синтеза, автор получает серию наногелей, содержащих разное количество бифункционального мономера. При этом оказалось, что после выделения частиц из системы обращенных мицелл и растворения в воде, их размер уменьшается с ростом степени сшивки. Это означает, что варьирование степени сшивки позволяет регулировать размер наногелей. По мнению автора, этот эффект вызывается изменением степени набухания частиц с изменением степени сшивки.

Существенное место в работе занимают эксперименты по изучению взаимодействия полианионов с полученными наногелями. Хорошо известно, что при взаимодействии с противоположно заряженными слабосшитыми макроскопическими гелями, полианион может проникать на всю глубину сетки. Однако, если взаимодействие с поверхностью происходит практически мгновенно, то проникновение заряженных макромолекул внутрь полимерной сетки может занимать многие дни и даже недели. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными в рецензируемой работе. Оказалось, что, несмотря на то, что все аминокислотные группы наногелей доступны для протонирования низкомолекулярной кислотой, лишь небольшая часть аминокислотных групп наногелей участвует в формировании солевых связей с полианионами. Измерения электрокинетического потенциала наногелей при их

взаимодействии с полианионами показали, что высокомолекулярный полистиролсульфонат натрия взаимодействует лишь с 30% аминогрупп наногелей, причем уменьшение степени полимеризации полианиона приводит к увеличению доли аминогрупп сетчатого полимера, доступных для образования полиэлектролитного комплекса. Нельзя исключить, что полученные цифры отвечают не состоянию равновесия, а скорее отражают колоссальное различие скоростей реакций полиэлектролитного обмена с поверхностными и погруженными в сетчатую структуру полимера аминогруппами. Таким образом, полученные в работе данные о доступности аминогрупп отражают экспериментально определяемую величину, соответствующую доле аминогрупп, принимающих участие в формировании связей за время эксперимента.

Сходный результат был получен и при изучении комплексов наногелей с нуклеиновыми кислотами. В этом случае для изучения комплексообразования были использованы два интеркалирующие красителя – бромистый этидий и SYBR GREEN I, флуоресценция которых резко понижается, когда они вытесняются поликатионом из комплекса с двуспиральной ДНК. Оказалось, что и в этом случае при взаимодействии с ДНК также лишь небольшая часть аминогрупп поликатиона принимает участие в формировании комплекса. И в этих комплексах также были обнаружены свободные от взаимодействия с фосфатными группами ДНК аминогруппы.

Авторы предположили, что наличие в наногелях фракции аминогрупп, не принимающей участия в образовании солевых связей с полианионами, можно использовать для придания буферных свойств комплексам наногеля с нуклеиновой кислотой. Действительно, в наногеле есть аминогруппы, которые не могут взаимодействовать не только с нуклеиновой кислотой, но и с полианионами на поверхности клеточной мембраны. Тогда при попадании таких комплексов в эндосомы эти спрятанные внутри частиц аминогруппы будут связывать протоны, повышая эндосомальное значение рН, и вызывая осмотическое набухание везикул по механизму протонной губки. Это предположение дает возможность надеяться, что комплексы наногелей с нуклеиновыми кислотами могут проникать в клетки, донося нуклеиновые кислоты до внутриклеточных мишеней.

Оказалось, что это предположение отчасти оправдалось в экспериментах с плазмидной ДНК и полностью подтвердилось в опытах с малой интерферирующей РНК. Оказалось, что наногели проявляли невысокую эффективность в отношении доставки плазмидной ДНК, однако и в этих опытах проявлялась ясная тенденция, что наногель, содержащий 2% сшивающего агента обеспечивал на порядок более высокую трансфекцию, чем линейный полимер аналогичной структуры.

Поскольку биологическая активность плазмидной ДНК проявляется лишь в ядре, автор предположил, что большей эффективности доставки удастся добиться, если в качестве генетической макромолекулы взять малую интерферирующую РНК, которая проявляет свою активность в цитозоле. Для этих экспериментов была использована линия клеток устойчиво трансфицированных геном светляковой люциферазы, а в качестве миРНК использовалась последовательность, направленная к гену люциферазы. При этом для учета неспецифических токсических эффектов самой миРНК и катионного носителя авторы использовали также контрольную миРНК, направленную против генома вируса РСВ. В этом случае оказалось, что эффективность доставки РНК очень высока и вполне соответствует требованиям к катионным носителям для малых интерферирующих РНК.

В заключительной части работы автор делает попытку доказать эффект осмотического набухания и разрушения эндосом под действием катионных наногелей. Для этого используется остроумный подход, основанный на использовании рН-чувствительного зонда кальцеина. Этот гидрофильный краситель не способен связываться с мембранами, и проникает в клетки путем эндоцитоза. При этом, попав в кислые органеллы, он флуоресцирует очень слабо. Если после этого к таким нагруженным кальцеином клеткам добавить поликатионы, то флуоресценция красителя несколько возрастает. При этом оказалось, что в образцах с наногелями флуоресценция оказывается заметно выше, чем в образцах, обработанных линейным полимером. Таким образом, в работе доказывается участие аминокислотных групп, находящихся во внутренней части наногеля и поэтому не участвующих в полиэлектролитных реакциях с клеточными полианионами, в защелачивании и осмотическом разрушении эндосом.

Итак, работа Максимовой Е.Д. построена очень логично: разработка синтеза поликатионного носителя, изучение его свойств с точки зрения влияния на них сетчатой структуры, изучение свойств комплексов с полианионами (модельными и разными природными нуклеиновыми кислотами), эксперименты на живых клетках, подтверждающие предположение о правильности наличия сетчатой структуры.

Работа производит впечатление целостного исследования: от разработки метода синтеза наногелей до их применения.

Однако, по работе можно сделать некоторые замечания:

1. На странице 72 приведены кривые титрования линейного ПДМАЭМА и наногелей, на которых видно два скачка. По всей видимости, представление этих данных не совсем корректно, поскольку при высоких значениях рН титруются не аминокислотные группы полимеров, а избыток добавленной щелочи.

2. Известно, что многие поликатионы при взаимодействии с клетками адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности клеточных мембран и не проникают в клетку. Позволяют ли полученные диссертантом результаты утверждать, что ПДМАЭМА и наногели проникают в живые клетки?
3. Диссертант подробно исследовал образование комплексов ДМАЭМА и наногелей с двухцепочечной ДНК и малой двухцепочечной РНК. Влияет ли конформация и наличие Уотсон-Криковских пар в нуклеиновой кислоте на формирование комплексов с поликатионами? Что известно о комплексообразовании одноцепочечных нуклеиновых кислот с поликатионами?
4. Диссертант в своей работе демонстрирует, что эффект протонной губки усиливается с ростом степени сшивки катионных наногелей. Может ли повлиять сетчатая структура на буферные свойства еще более слабых полиаминов - полиамидамина или поли-(N-винилимдазола)?

Приведенные выше замечания не снижают научной ценности и значимости представленной работы, а носят характер пожеланий и предложений по ее дальнейшему развитию.

Материалы диссертации опубликованы в 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, неоднократно докладывались на российских и международных научных конференциях. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

По актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и практической значимости диссертационная работа Максимовой Е.Д. соответствует требованиям п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. Результаты работы соответствуют 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» и п. 14 в части «Исследования молекулярных механизмов реагирования клеточных компонентов и живых организмов на проникающую радиацию, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, электромагнитные поля, механические, холодовые, тепловые, химические, токсические и другие экстремальные воздействия» паспорта специальности 03.01.04 – «Биохимия» (химические науки), а сама Максимова Е.Д. несомненно заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 - высокомолекулярные соединения, химические науки и 03.01.04 – биохимия, химические науки.

Доктор химических наук,  
(02.00.06 - высокомолекулярные соединения),  
профессор кафедры  
«Химия и технология высокомолекулярных соединений»  
федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
образования "Московский технологический университет"  
Заслуженный деятель науки  
Российской Федерации  
+7 (495)2460555 доб. 8-63, +7(903)2524792  
[zubov@ibch.ru](mailto:zubov@ibch.ru)

Зубов Виталий Павлович

Почтовый адрес организации  
119454, г. Москва, Проспект Вернадского, д. 78

Подпись Зубова В.П. удостоверяю

«18» марта 2016 г.

Первый проректор МТУ



15 апреля 2016 г.

### Сведения об официальном оппоненте

по диссертации Максимовой Екатерины Дмитриевны

«Катионные наногели: синтез, свойства и использование для транспорта нуклеиновых кислот в живые клетки» по специальностям 02.00.06 - высокомолекулярные соединения, химические науки, 03.01.04 – биохимия, химические науки на соискание ученой степени кандидата химических наук

|   |  |
|---|--|
| Фамилия, имя, отчество  | Зубов Виталий Павлович   |
| Гражданство   | РФ   |
| Ученая степень (с указанием шифра специальности научных работников, по которой защищена диссертация)  | Доктор химических наук<br>02.00.06 - высокомолекулярные соединения, химические науки   |
| Ученое звание (по кафедре, по специальности)  | профессор по кафедре   |
| Место работы  |  |
| Почтовый индекс, адрес, web-сайт, электронный адрес организации   | 119454 г. Москва, проспект Вернадского, дом 78, <a href="https://www.mirea.ru">https://www.mirea.ru</a> , <a href="mailto:mirea@mirea.ru">mirea@mirea.ru</a> |
| Полное наименование организации соответствии с уставом  | Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский технологический университет"                                |
| Должность   | Профессор (кафедра «Химия и технология высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева»)  |
| Публикации по специальности 02.00.06 - высокомолекулярные соединения, химические науки (4-5 публикаций за последние 5 лет, в том числе обязательно указание публикаций за последние 3 года):  |  |
| 1. Каширина Е.И., Решетов П.Д., Алексеева Л.Г., Хлгтян С.В., Рязанцев Д.Ю., Гурьянова С.В., Зубов В.П., Свирщевская Е.В. / Капсулирование аллергенов клещей домашней пыли в наночастицы на основе хитозана и альгината // Российские нанотехнологии, 2015, Т. 10, № 7-8, С. 98 – 104. Импакт-фактор 1, 271.           |  |
| 2. Generalova A.N., Kochneva I.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Guller A.E., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A.V., Deyev S.M. / Submicron polyacrolein particles in situ embedded with upconversion nanoparticles for bioassay. // Nanoscale, 2015, V.7, №5, P. 1709 – 1717. Импакт –фактор 7,39 |  |
| 3. Prokhorova E.V., D'yakova M.G., Zubov V.P., Shevlyakova N.V., Tverskoy V.A. / Features of styrene copolymerization with sodium p-styrenesulfonate in solvents of different polarities. // Polymer Science. Ser. B, 2014, V. 56, № 1, P. 231 – 243. Импакт –фактор 0,64   |  |
| 4. Kapustin D.V, Prostyakova A.I., Alexeev Y.I., Varlamov D.A., Zubov V.P., Zavriev S.K.. / High-throughput Method of One-Step DNA Isolation for PCR Diagnostics of Mycobacterium tuberculosis // Acta Naturae, 2014, V. 6, № 2, P. 48 – 52. Импакт –фактор 1,0   |  |
| 5. Generalova A.N., Oleinikov V.A., Sukhanova A., Artemyev M.V., Zubov V.P., Nabiev I. / Quantum dot-containing polymer particles with thermosensitive fluorescence. // Biosensor and Bioelectronics, 2013, V.39, P. 187-193. Импакт –фактор 5,437  |  |

Официальный  
оппонент  
Верно  
Первый проректор



В.П. Зубов

Н.И. Прокопов

«21» сентября 2016 г.