

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ивановой Анны Валерьевны «Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа в исследовании клеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки)

### **Актуальность темы диссертационной работы.**

За счет высокого разрешения до 0,1 нм электронная микроскопия становится все более популярным методом исследования биологических структур на субмолекулярном уровне. Исследование распределения и взаимодействия биомолекул (белков, ДНК, РНК, и др.) между собой в клетке для различных биохимических применений является актуальной задачей, не решенной в полной мере до сих пор. Коллоидное золото – широко используется, применяется в качестве электронно-плотного маркера антител для детекции биомолекул в клетке методом просвечивающей электронной микроскопии. Также есть возможность использования наночастиц золота разного размера, однако такой подход весьма трудоемок и ограничивается двумя исследуемыми мишенями. Поиск новых конъюгатов для одновременной визуализации нескольких внутриклеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии до сих пор остается актуальным. Таким образом, актуальность темы работы Ивановой А.В., а именно создание конъюгатов наночастиц на основе сложных оксидов железа с различными двухвалентными катионами металлов, с антителами для визуализации белковых молекул в клеточных структурах методом просвечивающей электронной микроскопии, не вызывает сомнений.

### **Цель диссертационной работы.**

Цель диссертационной работы Ивановой А.В. состоит в создании конъюгатов наночастиц, на основе сложных оксидов железа с различными двухвалентными катионами металлов, с антителами для визуализации белковых молекул в клеточных структурах методом просвечивающей электронной

микроскопии. Цель работы и применяемые методы полностью соответствуют паспорту специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки).

Для достижения данной цели автор сформулировал и решил следующие задачи:

1. Разработать методики синтеза наночастиц сложных оксидов железа, с размером  $< 20$  нм, с элементным соотношением катионов металлов максимально приближенным к 1:2;
2. Разработать функциональные покрытия, позволяющие получать стабильные коллоидные суспензии наночастиц, несущие функциональные группы для модификации с антителами;
3. Исследовать иммунохимическую активность антител после конъюгации с модифицированными наночастицами сложных оксидов железа;
4. Показать возможность визуализации биомолекул в клеточных структурах с использованием конъюгатов наночастиц с антителами методом просвечивающей электронной микроскопии.

#### **Новизна, теоретическая и практическая значимость работы.**

Полученные в диссертационной работе результаты оригинальны и обладают несомненной научной новизной, а также теоретической и практической значимостью. Автором была разработана оригинальная методика синтеза наночастиц сложных оксидов железа в бензиловом спирте, а также исследовано влияние бензилового спирта и дибензилового эфира совместно с олеиновой кислотой на элементный состав получаемых наночастиц. Показано, что использование молекул 3,4-дигидроксибензилуксусной кислоты и молекул полиэтиленгликоля для функционализации поверхности наночастиц дает возможность получать стабильные водные коллоидные растворы, позволяющие провести конъюгацию с антителами с сохранением их иммунохимической активности. Автор также показал, что конъюгаты наночастиц с антителами способны связываться с белковыми антигенами в клеточных компартаментах и могут быть визуализированы методом просвечивающей электронной микроскопии. Кроме того, впервые была проведена энергодисперсионная рентгеновская

спектроскопия в тандеме со сканирующей темнопольной электронной микроскопией с кольцевым детектором электронов рассеивающим на высокие углы в темном поле, который позволил обнаружить с высоким разрешением единичные наночастицы феррита кобальта, связанные с белковым антигеном презентированным в митохондриях, и удалось достоверно идентифицировать катионный состав таких наночастиц.

### Содержание диссертации

Диссертация Ивановой А.В. выстроена традиционным образом, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, содержит выводы по работе и библиографический список литературы из 238 наименований. Работа изложена на 145 страницах, содержит 17 таблиц и 47 рисунков.

Во введении автор обосновывает актуальность проводимого исследования, описывает его теоретическую и практическую значимость, научную новизну, степень разработанности темы, цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, методологию и методы исследования, а также приводит информацию о степени достоверности и апробации работы, о количестве публикаций по теме исследования, структуре и объеме работы.

В экспериментальной части автор дает описание методик синтеза наночастиц, методологиях и методах их исследования, в том числе проводит подробное описание протоколов *in vitro* и подробное описание пробоподготовки клеточных срезов для электронной микроскопии. Используемые методики исследования ясно изложены, структурированы, в связи с чем представляются легко воспроизводимыми. Используемые в работе методы исследования также являются надежными, воспроизводимыми и обоснованными.

В разделе «обсуждение результатов» приведено подробное описание и анализ полученных результатов. Автором был разработан метод синтеза наночастиц сложных оксидов железа с контролируемым элементным составом. Полученные результаты позволили использовать наночастицы из бензилового спирта, как перспективный материал для конъюгации с антителами и создания нанозонда, что было подтверждено в ходе экспериментов *in vitro* на ультратонких

срезах клеток рака предстательной железы человека РС3 при проведении электронной микроскопии.

Заключения и выводы по работе полностью соответствуют ее цели и поставленным задачам. Автореферат диссертации в полной мере отражает актуальность исследования, его цель, научную новизну, основные результаты и выводы по работе. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

#### **Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов**

Степень достоверности представленных количественных данных определяется инструментальной погрешностью использованного аналитического оборудования, статической обработкой полученных результатов и сопоставлением полученных результатов с общеизвестными литературными данными.

#### **Замечания по работе и рекомендации**

1. Стр.13 представлен неудачный русский перевод STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), который искажает суть метода - микроскопия на основе **появления** спонтанного испускания. Корректный перевод - микроскопия на основе **подавления** спонтанного испускания.
2. Стр.15. Автор пишет: "В **1944** году **финским** ученым Штеффаном Хеллем был предложен новый тип сканирующего флуоресцентного микроскопа с разрешающей способностью до 35 нм [14]." Штеффан Хелль - немецкий ученый, он родился в **1962** году. Он работал в Финляндии с 1993-1996 гг, но он не является финским ученым. Ссылка 14 - за **1994**, а не 1944. Хелль получил Нобелевскую премию в 2014 за STED. Хелль показал в одной из своих работ, что разрешение может быть на уровне единиц нанометров, для неорганических объектов. Эту информацию можно найти [Figure 14, Nanoscopy with Focused Light Nobel Lecture, December 8, 2014 by Stefan W. Hell, <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/hell-lecture.pdf>].

3. Стр.17. Автор пишет: "Основной недостаток STED-микроскопии - относительно высокая стоимость системы из-за применения мощных лазеров и очень фотостабильных флуорофоров." Почти все методы сверхвысокого разрешения используют фемтосекундные лазеры и все системы стоят дорого. Основным недостатком STED является большие значения мощности лазера, необходимые для подавления спонтанной эмиссии, и как следствие повышается вероятность обесцвечивания красителя, именно в связи с этим появляется требование фотостабильных флуорофоров. Но эту проблема удалось решить в GSD и RESOLFT микроскопах сверхвысокого разрешения [<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/hell-lecture.pdf>].
4. Стр.20. Рисунок 6. Отсутствуют размерные отрезки, также как и ссылки на работы откуда они были взяты; Стр.22. Рисунок 7. Отсутствует ссылка на работы откуда была взята схема; Стр.25 Рисунок 9. Отсутствуют размерный отрезок, также как и ссылка на работу откуда изображение было взято.
5. Стр.37 Таблица 1. Не хватает информации о ссылках на работы из которых была взята информация, например, о температуре синтеза или о недостатках методов.
6. Стр. 82 рисунок 31Г, отсутствуют доверительные интервалы, нет оснований соединять экспериментальные точки, используя прямые.

**Соответствие работы требованиям, предъявляемым к диссертациям**

Результаты, представленные в диссертации, отражены в 16 печатных работах, в числе которых издания из перечня РИНЦ, Scopus/Web of Science (1-й и 2-й квартиль), патент, ноу-хау и тезисы конференций. Опубликованные статьи по своей тематике полностью соответствуют паспорту специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки). Кроме того работы апробированы на многочисленных отечественных и международных конференциях.

## Заключение

Диссертация Ивановой А.В. на тему «Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа в исследовании клеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой отражены основные научные результаты, посвященные получению наночастиц сложных оксидов железа и исследованию визуализации биомолекул методом электронной микроскопии. Результаты исследований, представленные в работе, вносят существенный вклад в развитие нанотехнологии и биомедицины. Диссертация Ивановой А.В. на тему: «Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа в исследовании клеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии» соответствует требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», предъявляемым к работам на соискание степени кандидата наук, а ее автор Иванова Анна Валерьевна заслуживает присуждение степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки).

Официальный оппонент:

д.х.н., проф. центра фотоники и фотонных технологий  
Автономной некоммерческой образовательной организации  
высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

22 июля 2024 года



Д.А. Горин

Горин Дмитрий Александрович  
д.х.н. по специальности 02.00.04 «Физическая химия»  
профессор по специальности 03.01.02 «Биофизика»  
Адрес: 143026, Москва, ул. Нобеля, д. 3, Автономная  
некоммерческая образовательная организация высшего  
образования «Сколковский институт науки и технологий»

Тел: +7 (495) 280-14-81

Е-mail: [d.gorin@skoltech.ru](mailto:d.gorin@skoltech.ru)

Подпись д.х.н., профессора Д.А. Горина заверяю

