

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Ивановой Анны Валерьевны

на тему «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)

Исследование распределения и взаимодействия биомолекул (белков, ДНК, РНК, и др.) между собой в клетке для различных биохимических применений пользуется широким вниманием в современной научной литературе. Электронная микроскопия за счет своего высокого разрешения до 0.1 нм становится все более популярным методом исследования биологических структур на субмолекулярном уровне. Для большинства научных исследований интересно и необходимо проводить одновременную детекцию нескольких мишеней. В настоящее время существует только один единственный сложный и трудоемкий подход для решения этой задачи - использование наночастиц коллоидного золота разного размера в качестве электронно-плотного маркера антител для детекции биомолекул. Наночастицы сложных оксидов железа конъюгированные с антителами являются интересными и перспективными системами для решения этой проблемы. Актуальной задачей является 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.

Диссертация Ивановой А.В. состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, раздела с результатами экспериментальных исследований и их обсуждением, заключения и списка цитируемой литературы. Материалы изложены на 145 страницах, содержат 17 таблиц, 49 рисунков, введение, 3 главы, заключение и список используемых источников (238 наименований).

Название работы отражает содержание диссертации. Во введении (с. 5-10) обоснована актуальность темы диссертации и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования. Также представлены научная

новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту. Приведены сведения, которые подтверждают достоверность полученных результатов и личный вклад автора, указано число публикаций и описана структура диссертации.

В литературном обзоре (с.11-45) приведен интересный материал, посвященный методам визуализации биомолекул, в частности, световой, флуоресцентной и электронной микроскопии. Очень подробно описаны методы получения наночастиц и стабилизации их поверхности. Приведены методы конъюгации наночастиц с высокоспецифичными биомолекулами.

В экспериментальной части диссертации (с.48-60) Ивановой А.В. подробно описаны использованные в работе химические реактивы, экспериментальные методики и методы анализа полученных наночастиц. Следует отметить, что экспериментальная часть выполнена на высоком уровне с применением современных физико-химических методов исследования, таких, как ПЭМ, СПЭМ, ЭДРС, РФА, мёссбауэровская спектроскопия, ИК-спектроскопия, магнитометрия, МП-АЭС, ДСР, спектрофотометрия, конфокальная микроскопия. Содержание данного раздела позволяет считать, что полученные автором данные являются **достоверными**.

Основные результаты диссертации и их обсуждение состоят из четырех разделов (с.60-110), отражающих основные результаты работы.

В первой части Ивановой А.В. описаны данные по разработке методике получения наночастиц магнетита и наночастиц сложных оксидов железа, таких как феррит марганца, феррит кобальта и феррит цинка. В результате автором было установлено, что синтез наночастиц сложных оксидов железа в дибензиловом эфире с добавлением олеиновой кислоты приводит к образованию ферритовых наночастиц, однако элементный состав непредсказуемо варьируется в диапазоне от 1:4 до 1:16, тогда как плановое элементное соотношение металлов в составе наночастиц должно быть 1:2. Однако, элементное соотношение металлов в наночастицах, полученных в бензиловом спирте, хорошо коррелировало с соотношением вводимых в реакцию металлсодержащих прекурсоров ($M:Fe=1:2$, $M:Fe=1:6$ и $M:Fe=1:10$). Важным представляется то, что элементное соотношение металлов в составе наночастиц воспроизводится в трех независимых синтезах. Для объяснения полученных результатов Иванова А.В. рассмотрела механизмы реакций, протекающих при

формировании наночастиц.

Второй раздел обсуждения результатов посвящен функционализации поверхности наночастиц органическими лигандами, которые, с одной стороны, обеспечивали бы высокую стабильность наночастиц в солевых буферах, а с другой – позволили бы ковалентно закрепить на наночастицы молекулы антител. Для этих целей Иванова А.В. использовала 3,4-дигидроксибензилуксуную кислоту. Однако, было выявлено, что после модификации наночастицы хорошо диспергируются в dH_2O , но образуют крупные агрегаты и выпадают в осадок в фосфатно-солевом буфере. Поэтому автором была успешно проведена дополнительная модификация терминальных карбоксильных групп 3,4-дигидроксибензилуксунной кислоты молекулами гетеробифункционального аминокарбоксипроизводного полиэтиленгликоля по карбодиимидному методу, что позволило обеспечить высокую агрегативную стабильность наночастиц за счет появления дополнительного стерического фактора.

Важной частью третьего раздела представляется та, в которой обсуждаются результаты исследований по проведению реакции конъюгации наночастиц с антителами. Ивановой А.В. удалось разработать оптимальную методику «загрузки» антител на поверхность наночастиц и провести оценку иммунохимической активности антител методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конъюгаты наночастиц с антителами не теряют свою иммунохимическую активность. Показано, что антитела проявляют высокую эффективность связывания по отношению к выбранным мишеням: к одному из компонентов клеточного цитоскелета, белку микротрубочек α -тубулину; к многофункциональному белку межклеточных контактов β -катенину; к основным компартментам клетки, ядру и митохондриям.

Наконец, четвертый раздел, обсуждение результатов, посвящен в том числе визуализации локализации полученных конъюгатов наночастиц с антителами в клетке методом просвечивающей электронной микроскопии. Ивановой А.В. проведены иммунореакции конъюгатов наночастиц с антителами, специфичными к белкам α -тубулину и β -катенину, митохондриям, ядру. Получены и исследованы ультратонкие срезы клеток после иммуноцитохимического анализа. Следует отметить, что в дополнение к проведенным экспериментам Ивановой А.В. впервые была проведена СПЭМ-НАADF микроскопия митохондрии и получены изображения высокого разрешения, чтобы убедиться в точной локализации наночастиц.

В Заключении приведены вполне обоснованные выводы по проведенным исследованиям, надежность и достоверность которых не вызывает сомнений. Они подтверждаются всем экспериментальным материалом работы.

Список литературы оформлен в соответствии с требованиями и содержит в себе актуальные российские и зарубежные источники.

По диссертации Ивановой А.В. имеются некоторые рекомендации и замечания:

1. Несмотря на очень грамотное изложение материала, в диссертации имеется некоторое количество опечаток и нестыковок фраз;
2. Некоторые из рисунков, особенно в автореферате, практически без лупы рассмотреть невозможно, особенно обозначения внутри самих рисунков (рис. 5 автореферата, рис. 4 диссертации и др.);
3. Рис. 5 автореферата (рис. 36 диссертации). Не совсем понятно, почему точки были соединены ломаной линией. Что, по мнению автора, означают минимумы, максимумы и тенденция к увеличению или уменьшению размеров? Насколько это значимые данные?
4. Рис. 6 автореферата (рис. 38 диссертации). Как можно объяснить уменьшение PDI при увеличении размеров наночастиц (Б)?

Следует отметить, что приведенные выше рекомендации и замечания не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки диссертации Ивановой А.В.

Основные положения диссертации опубликованы в печати. Среди публикаций четыре статьи, индексируемые в базах РИНЦ, Scopus/WoS. Имеется патент РФ и Ноу-хау. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Оценивая диссертационную работу Ивановой А.В. в целом, следует сказать, что автором выполнено большое по объему и оригинальное по постановке исследование, новизна и научная ценность которого состоят в том, что в нем разработана оригинальная методика синтеза наночастиц сложных оксидов железа в бензиловом спирте. 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 полиэтиленгликоля для функционализации поверхности наночастиц дает возможность получать стабильные водные коллоидные растворы наночастиц, позволяющие

провести конъюгацию с антителами с сохранением их иммунохимической активности. Показано, что конъюгаты наночастиц с антителами способны связываться с белковыми антигенами в клеточных компартментах и могут быть визуализированы методом ПЭМ. Впервые проведен ЭДСР анализ в тандеме с СПЭМ HAADF, который позволил обнаружить с высоким разрешением единичные наночастицы CoFe_2O_4 , связанные с белковым антигеном в митохондриях, катионный состав которых удалось достоверно идентифицировать.

Не вызывает сомнений, что диссертация Ивановой А.В. по объему, уровню выполнения, важности и актуальности полученных результатов полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа соответствует паспорту специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки).

Считаю, что автор диссертации Иванова Анна Валерьевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки).

Официальный оппонент:

д.х.н., профессор,
заведующий кафедрой химической энзимологии
химического факультета ФГБОУ
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
МГУ имени М.В. Ломоносова

07 августа, 2024 года

Н.Л. Клячко

Клячко Наталья Львовна
д.х.н. по специальности
02.00.15 «Кинетика и катализ (химические науки)»
Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б
ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова
Тел: +7 (495) 939-34-76
E-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru

Подпись д.х.н., профессора Н.Л. Клячко заверяю:

И.о. декана химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,
Д.х.н., профессор РАН



С. Карлов