

ОТЗЫВ

официального оппонента диссертации Ронишенко Богдана Вячеславовича на тему «Синтез конъюгатов белков и нуклеиновых кислот с неорганическими наноматериалами: квантовыми точками, окисленным графеном и наночастицами серебра» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10- биоорганическая химия

Диссертационная работа Ронишенко Б.В. выполнена в лаборатории химии биоконъюгатов ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси» и являлась частью плановых заданий лаборатории по ГПНИ «Конвергенция», ГПНИ «Промышленные био- и нанотехнологии-2020» и ГП «Научное обеспечение технологий и техника» в 2016-2020 гг.

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы (12. Междисциплинарные исследования), а также приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь (п. 6. «Био- и наноиндустрия» и п. 6.1. «Нанотехнологии»).

В диссертационной работе Ронишенко Б.В. представлены новые научные теоретические и экспериментальные результаты исследования по разработке методик синтеза, получению и применению конъюгатов полупроводниковых квантовых точек (КТ), окисленного графена (ОГ) и наночастиц серебра ($AgHCl$) с биомолекулами, а также новых методов характеристики модифицированных неорганических наноматериалов, в том числе количественной оценки функциональных групп в их структуре.

Диссертантом самостоятельно выполнена большая по объему и сложности экспериментальная работа, которая свидетельствует о высокой профессиональной квалификации автора в области биоорганической химии.

Оценка диссертации по существу:

1. Предметом диссертационной работы являются методы синтеза конъюгатов неорганических наноматериалов с белками и нуклеиновыми кислотами. Ронишенко Б.В. выполнено большое количество экспериментов по синтезу и модификации наноматериалов, в том числе иммобилизованных на поверхности стекла, разработаны и/или усовершенствованы методы синтеза, очистки, выделения и характеристики конъюгатов на основе квантовых точек и окисленного графена с красителями и биомолекулами. Полученные экспериментальные результаты в диссертации представлены и обсуждены с точки зрения соответствия поставленной цели. На основе анализа содержания диссертации, автореферата и опубликованных работ считаю, что диссертация Ронишенко Б.В. *соответствует специальности 02.00.10 – биоорганическая химия и отрасли науки – химия, по которым она представлена к защите.*

Актуальность темы диссертации. Современная медицина и фармацевтика испытывают все большую потребность в высокотехнологичных материалах, позволяющих создавать готовые лекарственные и диагностические средства. С этой точки зрения высокий практический потенциал применения благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам имеют неорганические наноструктурированные материалы, такие как квантовые точки, наночастицы металлов и др. В настоящий момент разработаны воспроизводимые методы получения наноматериалов с заданными свойствами. Однако по-прежнему существует ряд ограничений широкого практического применения подобных структур. Эффективным подходом для преодоления существующих проблем, таких как цитотоксичность, низкая агрегативная устойчивость, недостаточная биодоступность и неспецифичность биологического действия названных наноматериалов является их конъюгирование с биомолекулами. Разработка методов синтеза конъюгатов тесно связана с исследованием структуры и свойств поверхности

наноматериалов, изучением взаимосвязи «структура-свойства», разработкой унифицированных подходов функционализации поверхности наночастиц. Важным также является выбор биомолекул для конъюгирования и использования современных подходов биоорганической химии для проведения синтеза с участием лабильных биологически активных соединений. Важнейшими достижениями этой области органической и биоорганической химии является применение биоортогональных модульных (клик) реакций. Применение синтетически модифицированных биомолекул в качестве зондов в молекулярной диагностике и медицине привело к развитию химии биоконъюгатов и реагентов для их получения.

В связи с изложенным диссертационная работа Ронищенко Б.В., посвященная разработке новых эффективных методов синтеза конъюгатов неорганических наноматериалов (полупроводниковых квантовых точек, окисленного графена, наночастиц серебра) и биомолекул (белков и нуклеиновых кислот) с заданными свойствами (фотофизическими, химическими и биологическими), является несомненно актуальной. Применение биоортогональных реакций для синтеза биоконъюгатов и разработка методов эффективной очистки и выделения, а также методов количественной характеристики полученных материалов открывает возможности для создания инновационных биомаркеров на основе наноструктурированных материалов и их скорейшего практического применения в биомедицине.

2. Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на ее публичную защиту. Основные результаты, представленные в диссертационной работе, являются новыми или впервые полученными и способствуют углублению представлений о структуре и свойствах наноразмерных структур и закономерностях протекания биохимических процессов на их поверхности. Высокая степень новизны результатов, полученных в диссертации, подтверждается тем, что в рецензируемой диссертационной работе:

1) Впервые проведено комплексное исследование биоортогональной реакции конъюгации полупроводниковых квантовых точек с молекулами красителя и олигонуклеотидного дуплекса путем безмедного азид-алкинового циклоприсоединения: изучено влияние фактора электростатического отталкивания на процесс конъюгации, исследована кинетика реакции, оценено влияние структуры поверхности (природы и количества функциональных групп) квантовых точек на эффективность процесса конъюгирования и предложены оптимальные условия, обеспечивающие эффективный синтез конъюгатов КК с олигонуклеотидами.

2) разработана методика синтеза новых конъюгатов КК с флуоресцентным красителем JOE с переносом энергии, обеспечивающая контролируемое варьирование количества молекул красителя на квантовую точку и получение образцов с заданными оптическими свойствами.

3) разработана методика модификации поверхности стекла и кремния полиэтиленимином (ПЭИ) для иммобилизации наночастиц серебра и ОК, которая позволила предложить новый метод характеристики морфологии частиц графена с помощью сканирующей электронной микроскопии.

4) разработан метод определения концентрации функциональных групп на поверхности ОГ, включающий его предварительную иммобилизацию на поверхности модифицированного ПЭИ стекла и последующую функционализацию диметокситретильными группами. Показана возможность использования предложенного метода для оценки концентрации эпоксидных групп на поверхности ОГ.

5) установлено, что величина сигнала гигантского комбинационного рассеивания при использовании в качестве ГКР-субстратов AgНЧ существенно зависит от электростатического взаимодействия частиц и молекул аналита. Показано, что добавление ионов меди в аналит в этом случае является эффективным способом активации сигнала

гигантского комбинационного рассеивания анионных молекул, в частности олигонуклеотидов.

3. Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Все экспериментальные результаты получены с использованием комплекса взаимодополняющих физических, физико-химических и химических методов. Методы обработки первичных экспериментальных данных корректны, все научные положения, утверждения и выводы четко сформулированы, логически обоснованы, подтверждены результатами эксперимента и необходимым образом увязаны с литературными данными, в связи с чем их обоснованность и достоверность не вызывает сомнений.

5 Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию. Научная значимость работы состоит в конкретных результатах диссертации, которые являются вкладом соискателя в разработку универсальной методологии модификации неорганических наноструктур, а также синтеза и характеристики биоконъюгатов на их основе. В их числе:

- эффективные универсальные методики модификации неорганических наноматериалов, обеспечивающие последующую контролируруемую конъюгацию с биомолекулами (олигонуклеотидами и белками);
- новая методика синтеза конъюгатов квантовых точек с красителем JOE, обеспечивающая контролируемое варьирование количества молекул на одну квантовую точку и получение образцов с заданными фотофизическими свойствами;
- комплекс данных, в том числе кинетических закономерностей и влияния электростатического взаимодействия компонентов, процесса конъюгирования квантовых точек с красителем JOE путем циклоприсоединения, промотированного напряжением в цикле;
- методика функционализации поликатионами поверхности твердофазных носителей, заключающаяся в модификации поверхности стеклянных или кремниевых подложек 3-хлорпропилтрихлорсиланом и последующем нуклеофильном замещении хлорпропильных групп аминогруппами разветвленного полиэтиленimina (25 кДа). Использование функционализированных подложек для эффективной иммобилизации наночастиц серебра и окисленного графена;
- новый способ определения концентрации функциональных групп окисленного графена, основанный на иммобилизации его частиц на поверхности функционализированного ПЕИ стекла, химической трансформации функциональных групп в диметокситретильные и последующем фотометрическом анализе. Использование разработанного метода для оценки концентрации эпоксидных групп в структуре окисленного графена, а также количественное исследование стабильности различных модификаций АГ;
- новый способ визуализации окисленного графена методом сканирующей электронной микроскопии, заключающийся в последовательной адсорбции наночастиц графена и электронококонтрастных наночастиц серебра на электропроводящих кремниевых подложках, функционализированных ПЭИ.
- Предложенный подход усиления ГКР-сигнала анионных аналитов на субстратах на основе наночастиц серебра за счет инверсии заряда аналита в присутствии добавок ионов меди.

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты исследования неорганических наноструктур и их биоконъюгатов использованы для разработки методических материалов и внедрены в учебный процесс Гомельского государственного медицинского университета: лабораторный практикум курса «Медицинская и биологическая

физика». Это имеет социальную значимость, поскольку обеспечивает повышение уровня знаний обучающихся в области современной биохимии и нанотехнологии.

Практическая значимость диссертации является очевидной, т.к. проведенное исследование и полученные научные результаты могут явиться основой для разработки инновационных высокочувствительных агентов для биомедицинского применения: *in vitro* диагностических и аналитических систем, агентов для тераностики, препаратов адресной доставки биологически активных веществ. **Практический потенциал имеют следующие материалы и методы, описанные в работе:**

- Предложенные методики модификации КК, ОГ и наночастиц серебра могут быть применены для функционализации широкого спектра наноструктур.
- Синтезированные конъюгаты квантовых точек, окисленного графена, наночастиц серебра с белками и олигонуклеотидами перспективны для создания высокочувствительных биоаналитических систем.
- Разработанные методы характеризации наноструктур могут обеспечить процесс стандартизации нанообъектов и преодоления ряда ограничений их практического применения.
- Полученные данные об особенностях взаимодействия ГКР-субстратов на основе наночастиц серебра и молекул аналита позволят создавать новые аналитические системы для широкого спектра органических соединений.
- Предложенный способ усиления ГКР-сигнала за счет введения ионов меди в анионный аналит является недорогим и аппаратно простым, что открывает перспективы для создания конкурентоспособных аналитических систем для анализа олигонуклеотидов.

6. Опубликованность результатов диссертации в научной печати.

Основные результаты диссертации опубликованы в печати и представлены 14 научными работами, в том числе 7 статьями в рецензируемых научных журналах и тезисах 7 докладов конференций.

Объем публикаций, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», составляет 4.2 авторских листа. Научные публикации автора достаточно полно отражают содержание диссертации. Необходимо подчеркнуть, что 6 из 7 статей опубликованы в международных журналах. Материалы диссертационной работы апробированы на различных научных конференциях.

7. Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.

Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, списка использованных источников, собственных публикаций и приложений. Полный текст диссертации составляет 123 стр., библиографический список включает 155 наименований и список публикаций соискателя.

Обзор литературы (27 страниц текста диссертации) дает полную информационную картину по теме диссертации и акцентирует внимание на существующих проблемах обсуждаемой темы.

Аннотация полностью отражает все основные результаты диссертационной работы. Диссертация оформлена в соответствии с правилами ВАК РБ.

Критические замечания.

1. Необходимо отметить уникальность естественно-научной работы, написанной на белорусском языке, именно поэтому соискателю следует внимательно относиться к написанию названий функциональных групп и специфических терминов. Например, одновременное использование в тексте слов «фарба» и «фарбавальнік», хотя по

отношению к химическому красителю правильнее использовать последний вариант. Употребление слова «трытычны» вместо «трацічны» или «троесны» амин. Для «дыметоксітрытыльнага» катиона и «мечанага» белка возможно стоит подобрать более подходящий перевод, например, «дыметоксітрацільны» и «пазначаны». Следует придерживаться единообразия в подписях к рисункам (например, рис. 2.24 и 2.32 диссертации): «Вьявы» или «Здымкі» наночастиц серебра.

2. Отсутствует описание расчета или способа оценки начальных скоростей реакции конъюгации.

3. Некорректным является использование термина наночастицы по отношению к образцам окисленного графена, синтезированного в работе, поскольку его частицы, как указано в тексте диссертации, имеют размер менее 500 нм, но более 100 нм, т.е. субмикронный.

4. По сравнению с квантовыми точками и окисленным графеном структура поверхности синтезированных наночастиц серебра практически не описана, на схемах модификации (рисунок 2.37 и 2.39) наночастицы представлены как абсолютно поверхностно-инертный материал с нулевым значением ζ -потенциала и отсутствием собственных функциональных групп на поверхности.

5. В диссертации отсутствует описание метода статистического анализа полученных данных.

6. В работе соискатель сообщает о получении новых материалов и разработке новых методов характеризации наноструктур, однако отсутствуют данные о патентовании сделанных разработок.

Сделанные замечания ни в коей мере не умаляют значимость полученных автором результатов, не затрагивают сущности работы, носят, в основном, рекомендательный характер и не влияют на положительное впечатление от рукописи и на высокую оценку ее научного и практического значения.

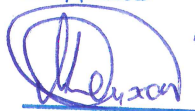
8. Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует. Диссертационная работа Ронишенко Богдана Вячеславовича на тему «Синтез конъюгатов белков и нуклеиновых кислот с неорганическими наноматериалами: квантовыми точками, окисленным графеном и наночастицами серебра» по выбору направления исследований, актуальности решаемых проблем, научной новизне и практической значимости результатов соответствует требованиям п.п. 19, 20 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», является завершенным трудом и подтверждает высокую научную квалификацию автора.

На основании проведенного анализа материала диссертации, автореферата и публикаций соискателя считаю возможным присуждение Ронишенко Богдану Вячеславовичу ученой степени кандидата химических наук за новые научно-обоснованные результаты, перечисленные в п. 3 настоящего отзыва, научная и практическая значимость которых охарактеризована в п. 5. Проведенное соискателем исследование в совокупности вносит существенный вклад в развитие биоорганической химии и смежных дисциплин и позволяет прогнозировать создание новых инновационных высокочувствительных аналитических систем с улучшенными свойствами на основе биоконъюгатов заданной структуры для их практического применения в клинической диагностике и генной терапии.

Официальный оппонент
ведущий научный сотрудник

Института химии новых материалов НАН Беларуси
кандидат химических наук, доцент

Подпись



Гилевской К.С.

УДОСТОВЕРЯЮ

Ученый секретарь, к.х.н.
Михайловский Ю.К.



К.С. Гилевская