

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

Диссертация «Наноконтейнеры на основе амфифильных резорцинаренов для управляемого связывания/высвобождения лекарственных средств и стабилизации наночастиц серебра» выполнена в лаборатории химии каликсаренов Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

В период подготовки диссертации Сергеева Т. Ю. являлась аспирантом очной формы обучения по направлению подготовки 04.06.01 Химические науки, профиль (направленность) подготовки 02.00.04 – Физическая химия в лаборатории химии каликсаренов ИОФХ им. А.Е. Арбузова - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН.

В 2015 году Сергеева Т.Ю. окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" по специальности «Химия».

Справка об обучении и сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2019 году ФИЦ КазНЦ РАН.

Научный руководитель – к.х.н. Зиганшина Альбина Юлдузовна – работает старшим научным сотрудником лаборатории химии каликсаренов ИОФХ им. А.Е. Арбузова - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН.

Диссертация Т. Ю. Сергеевой обсуждалась на заседании расширенного научного семинара ИОФХ им. А.Е. Арбузова – ОСП ФИЦ КазНЦ РАН по направлению «Физическая химия» (протокол № 3 от 01.10.2019 г.). На заседании присутствовало 43 человека, в их числе члены диссертационного совета Д 022.004.02 и Ученого совета Института: к.х.н. Ризванов И.Х., д.х.н. Хаматгалимов А.Р., д.х.н., доцент Романова И.П., д.х.н. Латыпов Ш.К., д.х.н., чл-кор. РАН Антипин И.С., д.х.н., профессор Коваленко В.И., д.х.н., доцент Соловьева С.Е., д.х.н., доцент Мустафина А.Р., д.х.н. Будникова Ю.Г., д.х.н. Балакина М.Ю., д.х.н., профессор Захарова Л.Я., д.х.н. Янилкин В.В., к.х.н., доцент Якубов М.Р., к.х.н. Торопчина А.В., а также сотрудники Института.

При обсуждении диссертации соискателю были заданы следующие вопросы:

д.х.н. Мустафина А.Р.:

Каков механизм глюкоза-управляемого распада наноконтейнеров? Какие связи в полимерных наноконтейнерах между резорцинаренами и фенилбороновой

кислотой?

Как выглядит УФ-спектр полимерных наноконтейнеров и чем он отличается от спектра резорцинарена?

С чем сравнивали результаты по инклюзивной активности наноконтейнеров?

Как устанавливали наличие среза в оболочке полимерного наноконтейнера?

Как использовали в работе комплексообразующие свойства резорцинаренов?

д.х.н. Соловьева С.Е.:

Чем отличаются между собой полимерные наносферы и нанокапсулы? Какими методами доказывали их структуру? Выходит ли незаполимеризованный стирол из нанокапсул?

д.х.н. Хаматгалимов А.Р.:

С чем связано повышенное поглощение доксорубина, инкапсулированного в наноконтейнер, в раковые клетки, по сравнению со свободным?

д.х.н. Будникова Ю.Г.:

Какие преимущества Ваших систем по сравнению с известными примерами в литературе, например, в каталитической активности наночастиц серебра?

Что такое гемолиз?

Фенилбороновая кислота – правильное ли название?

Замечания: заголовки слайдов не соответствуют их содержанию; цели не соответствуют полученным выводам.

д.х.н. Янилкин В.В.:

Чем определяется размер получаемых наноструктур?

Разрушается ли структура наноконструктов в процессе катализа?

Почему каталитическая активность наноконструктов на основе амфифильных резорцинаренов больше, чем на основе полимерных наноконтейнеров?

к.х.н. Паширова Т.Н.:

Был ли известен ранее метод создания полимерных наноконтейнеров, используемый Вами в работе?

В чем преимущества использования резорцинаренов в создании полимерных наноконтейнеров?

д.х.н. Коваленко В.И.:

Как проводили эксперименты с раковыми клетками?

На все поставленные вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

С рецензией на работу выступила к.х.н. С.В. Федоренко

Создание “интеллектуальных” материалов, способных откликаться на определённые внешние воздействия, является перспективным направлением в развитии нанотехнологического подхода в медицине, катализе, биоанализе, сенсорике и прочих областях. Диссертация Сергеевой Татьяны Юрьевны посвящена проблемам разработки методов синтеза и исследования свойств супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров для доставки лекарственных веществ (в частности, инсулина и доксорубина), и для получения каталитически активных наноконструктов, содержащих наночастицы серебра. Это обуславливает актуальность и практическую значимость работы.

В качестве объектов исследования автором были выбраны супрамолекулярные и полимерные наноконтейнеры на основе амфифильных производных резорцинаренов. Простота синтеза, варьированность размера, возможность модификации и способность к агрегации позволяют эффективно использовать резорцинарены в качестве матрицы для разработки наноконтейнеров.

При разработке темы исследования автором выбраны два направления. Первое – синтез, изучение инклюзивных характеристик полимерных наноконтейнеров на основе сульфонатометилированного и N-метилглюкаминового и карбоксилатного резорцинаренов и их сенсорной способности по отношению к рН и глюкозе. Вторым направлением являлся синтез и изучение свойств нанокомпозитов на основе карбоксилатных резорцинаренов и ферроцен-резорцинаренов и наночастиц серебра для дальнейшего использования в нанокатализе.

В связи с выше изложенным, тема и задачи диссертации Сергеевой Татьяны Юрьевны являются актуальными, имеют фундаментальную и прикладную значимость.

Диссертационная работа изложена на 173 страницах, включает введение, три главы, основные результаты и выводы, приложение и список использованных библиографических источников (229 наименований).

Во введении обоснована актуальность исследования, описана степень разработанности темы исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, представлены позиции научной новизны, теоретической и практической значимости, методология и методы исследования, обозначены положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, степень достоверности результатов исследования, апробация работы.

Первая глава (Литературный обзор) посвящена рассмотрению, систематизации и анализу литературных данных по синтезу и свойствам наноконтейнеров различной природы (липосомы, полимерные, стимул-чувствительные наноконтейнеры) для адресной доставки органических субстратов и созданию композиционных наноматериалов. Более подробно рассмотрены наиболее часто встречающиеся в литературе стимул-чувствительные наноконтейнеры, в частности, рН-, термо-, редокс-, фото-, ультразвук-, магнитно-, фермент-, глюкоза-чувствительные наноконтейнеры. Отдельные подглавы включают в себя данные о синтезе и возможных путях применения органо-неорганических нанокомпозитов и наноконтейнеров на основе резорцинаренов. Автором обозначено, что исследования, ранее проводимые в коллективе соискателя, однозначно подтверждают фундаментальную и практическую значимость ожидаемых научных результатов.

Основные результаты работы, полученные автором, и их обсуждение детально рассмотрены во второй главе диссертации. Подглава 2.1 главы 2 научно-квалификационной работы посвящена разработке методик синтеза полимерных наноконтейнеров на основе сульфонатометилированного резорцинарена и изучению их сенсорной способности к рН- и глюкозе. В подглавах 2.2 и 2.3 представлены разработанные методики получения и физико-химические свойства рН-управляемого полимерного наноконтейнера на основе N-метилглюкаминового резорцинарена и редокс-чувствительной наносферы на основе сульфонатного виологен кавитанда для адресной доставки доксорубина. Подглавы 2.4 и 2.5 посвящены созданию супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров на основе карбоксилатного и ферроцен-резорцинарена и наночастиц серебра.

Описание объектов исследования; методик синтеза исходных реагентов, супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров, нанокомпозитов с наночастицами серебра; методик катализа и формул расчета каталитических параметров; используемых физико-химических методов исследования полученных образцов (Глава 3) позволяют сделать вывод об адекватности использованных

автором методик для достижения поставленной цели.

В заключении представлены основные выводы и практические рекомендации по дальнейшему использованию результатов диссертационного исследования. Выводы диссертации соответствуют поставленной цели и заявленным задачам работы, являются логичными, достоверными и обоснованными. Они базируются на собственных экспериментальных данных диссертанта, имеют большую фундаментальную и практическую значимость, не имеют аналогов в литературе.

Основное содержание диссертационной работы Сергеевой Татьяны Юрьевны изложено в 7 статьях в рецензируемых журналах (6 из которых входят в список журналов, рекомендованных ВАК) и 27 тезисах докладов на Всероссийских и международных конференциях.

Достоверность полученных результатов и сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений и подтверждается использованием надежных синтетических методик исходных соединений и полимерных наноконтейнеров на их основе, а также широкого спектра физико-химических методов исследования - ЯМР, ИК, УФ-видимой, флуоресцентной, энергодисперсионной рентгеновской, атомно-эмиссионной спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма, масс-спектрометрии MALDI, динамического, статического и электрофоретического светорассеяния, атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии, порошковой рентгеновской дифракции, проточной цитометрии, кондуктометрии и рН-метрии.

В качестве наиболее значимых и интересных результатов проведённого автором исследования можно выделить следующие:

Впервые разработана методика синтеза и получен рН- и глюкоза-управляемый полимерный наноконтейнер на основе сульфатного резорцинарена и фенолбороновой кислоты. Показана возможность применения данного наноконтейнера для направленной доставки инсулина. Автором найдено, что при физиологически нормальном уровне глюкозы (5 мМ) из наноконтейнера высвобождается менее 10 % инсулина, а при концентрации глюкозы 10 мМ происходит разрушение наноконтейнера и выход инсулина достигает 100 %.

Разработана методика синтеза и получен полимерный наноконтейнер на основе N-метилглюкаминового производного резорцинарена и фенолбороновой кислоты для связывания и рН управляемой доставки доксорубина в раковые клетки. Показано, что полученный наноконтейнер стабилен при нейтральном рН, а выход доксорубина из наноконтейнера осуществляется при понижении рН до 4-5.

Разработана методика синтеза и получена редокс-чувствительная полимерная наносфера на основе сульфатного виологен-кавитанда и диаллилдисульфида для глутатион-управляемой доставки доксорубина в раковые клетки. Наноконтейнер показывает хорошую биосовместимость: не токсичен и гемолитически неактивен. Показано, что наноконтейнер связывает доксорубин, высвобождение которого происходит в присутствии в системе глутатиона.

Сравнены инклюзивные характеристики супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров на основе карбоксилатных производных резорцинарена в связывании органических субстратов. При высоких концентрациях как полимерные, так и супрамолекулярные наноконтейнеры эффективны при связывании гидрофобных субстратов. При низких концентрациях полимерные наносферы инкапсулируют гидрофобные субстраты, а нанокapsулы эффективны в отношении гидрофильных субстратов.

Разработаны композиции на основе наночастиц серебра и наноконтейнеров, состоящих из карбоксилатных производных резорцинарен. Показано, что композиты на основе супрамолекулярных наноконтейнеров демонстрируют более высокую стабильность и каталитическую активность, по сравнению с полимерными контейнерами.

Практическая значимость работы состоит в экспериментальном подтверждении перспективности использования наноконтейнеров на основе амфифильных производных резорцинарена для связывания инсулина и доксорубина. Обнаружена низкая гемолитическая активность и цитотоксичность полученных полимерных наноконтейнеров по отношению к здоровым клеткам. Показано увеличение степени проникновения инкапсулированного доксорубина в раковые клетки.

Тематика проведенных исследований соответствует паспорту специальности 02.00.04 – Физическая химия согласно пункту 4 «Теория растворов, межмолекулярные и межчастичные взаимодействия» и пункту 10 «Связь реакционной способности реагентов с их строением и условиями осуществления химической реакции».

Однако при знакомстве с научно-квалификационной работой (диссертацией) возникает ряд вопросов и замечаний, в частности:

1. Из текста научно-квалификационной работы непонятно, как были рассчитаны константы диссоциации, приведенные на стр. 55.

2. При обсуждении токсичности наноконтейнера на стр. 65 в тексте научно-квалификационной работы не приведен график зависимости жизнеспособности клеток от концентрации образца.

3. На рисунке 2.20 не приведен спектр эмиссии инсулина без наноконтейнера.

4. Из данных, приведенных на стр. 78, непонятно, почему причиной более высокого клеточного поглощения DOX@p(MEGRA-B) является именно эндоцитоз, а не другие механизмы.

5. В данных динамического светорассеяния, атомно-эмиссионной спектроскопии, рассчитанных эффективности и емкости инкапсуляции не приведены ошибки измерения и стандартные отклонения.

6. Чем обусловлен выбор восстановителя (и его концентрации) для синтеза наночастиц серебра? Хотелось бы видеть в тексте сопоставление полученных автором данных по стабилизирующей способности производных резорцинаренов с известными из литературы.

7. Часть рисунков в приложении не пронумеровано.

8. Не все подписи на рисунках сделаны на русском языке.

9. Выводы 3 и 7 (стр. 137, 138) требуют доработки.

Отмечу, что найденные замечания и недостатки работы не портят общее впечатление от обсуждаемой работы, а также не ставят под сомнение цель работы и положения, выносимые автором на защиту.

В работе содержится решение актуальной фундаментальной задачи, имеющей существенное значение в области физической химии и химии функциональных материалов.

По актуальности темы, научной новизне, практической значимости научно-квалификационная работа Сергеевой Татьяны Юрьевны «Наноконтейнеры на основе амфифильных резорцинаренов для управляемого связывания/высвобождения лекарственных средств и стабилизации наночастиц

серебра» соответствует критериям пп.9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. и может быть рекомендована для дальнейшего прохождения на Ученом Совете Института и последующего представления к публичной защите.

С поддержкой и рекомендациями выступили: д.х.н. Мустафина А.Р., д.х.н. Хаматгалимов А.Р. и д.х.н. Янилкин В.В. В выступлениях были отмечены достоинства работы и даны рекомендации по оформлению доклада.

По итогам обсуждения принято следующее **Заключение**.

Работа актуальна. Работа посвящена актуальной проблеме – созданию супрамолекулярных и полимерных носителей органических и неорганических субстратов для применения их в качестве векторов для доставки лекарственных средств и для получения каталитически активных композиционных материалов. Разработка молекулярных носителей важна для развития современной медицины и нанотехнологии. Наноносители необходимы для создания систем доставки лекарственных средств в очаги поражения, сенсоров, композиционных материалов для электроники и катализа. Введение лекарств в наноконтейнеры увеличивает их биодоступность, возможность преодоления биологических барьеров, и уменьшает ряд побочных эффектов. Создание композиционных материалов носителей с наночастицами металлов усиливает их стабильность и способствует формированию новых свойств за счет кооперативных эффектов, что влияет на связывание субстратов и каталитическую активность.

Работа обладает научной новизной и имеет практическую значимость.

В диссертационной работе представлены результаты по созданию наноконтейнеров для лекарственных средств и для создания композиционных материалов. В ходе выполнения диссертационной работы выявлены преимущества и недостатки супрамолекулярных и полимерных наноконтейнеров на основе амфифильных резорцинарен в связывании органических субстратов и получении каталитически активных нанокомпозитов. Синтезированы новые полимерные наноконтейнеры для лекарственных средств, чувствительные к повышенному уровню глюкозы, пониженным значениям рН и избыточному количеству глутатиона, которые возникают при патогенных изменениях в организме. В частности:

- Проведен сопоставительный анализ полимерных наноконтейнеров на основе карбоксилатных производных резорцинарена с их супрамолекулярными аналогами в связывании органических субстратов. Показано, что при высоких концентрациях как полимерные, так и супрамолекулярные наноконтейнеры являются эффективными системами для инкапсуляции гидрофобных субстратов. При низких концентрациях полимерные наносферы эффективны в инкапсуляции гидрофобных субстратов, в то время как полимерные нанокапсулы действенны в связывании гидрофильных субстратов.
- Разработаны композиции на основе наночастиц серебра и наноконтейнеров, состоящих из карбоксилатных производных резорцинарен, на основе которых могут быть созданы композиционные наноматериалы. Композиты на основе супрамолекулярных контейнеров демонстрируют более высокую стабильность и каталитическую активность, по сравнению с полимерными контейнерами. Реакция восстановления пара-нитрофенола в присутствии супрамолекулярных

- контейнеров протекает без индукционного периода, а наблюдаемая константа реакции больше, чем у композитов на основе полимерных наноконтейнеров.
- Получены рН- и глюкоза-управляемые полимерные наноконтейнеры на основе сульфатометилрезорцинарена и фенилбороновой кислоты. Показана их высокая эффективность в управляемом высвобождении органических гидрофобных и гидрофильных субстратов, в том числе инсулина при повышенной концентрации глюкозы в среде. При физиологической концентрации глюкозы 5 мМ высвобождается менее 10% инсулина, а при концентрации глюкозы 10 мМ происходит разрушение наноконтейнера и выход до 100% инсулина.
 - Для доставки лекарственного средства доксорубицина в раковые клетки линии M-Hela созданы нетоксичные гемолитически неактивные полимерные наноконтейнеры: редокс-управляемая наносфера р(SVCA-SS) на основе виологен резорцинарен кавитанда и рН-чувствительный полимерный наноконтейнер р(MEGRA-B) на основе N-метилглюкаминного производного резорцинарена и фенилбороновой кислоты. Установлено, что р(SVCA-SS) разрушается в присутствии глутатиона, что приводит к выходу доксорубицина из его полости. Наноконтейнер р(MEGRA-B) стабилен при физиологических значениях рН, а выход лекарства осуществляется при пониженных значениях рН.

Ценность научных работ соискателя. Работа имеет значение для разработки методов синтеза полимерных наноконтейнеров для управляемой доставки лекарственных веществ (инсулина и доксорубицина) при патогенных изменениях в тканях (повышенный уровень глюкозы, низкое рН и высокое содержание глутатиона). Созданы композициты с наночастицами серебра, которые демонстрируют высокую каталитическую активность в реакции восстановления п-нитрофенола.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

Достоверность представленных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, полученных с использованием комплекса современных физических и физико-химических методов исследования, таких как кондуктометрия, спектрофотометрия, флуоресцентная и ЯМР спектроскопия, динамическое, статическое и электрофоретическое рассеяние света, атомно-силовая, электронная микроскопия, энергодисперсионный анализ, порошковая дифрактометрия.

Личное участие автора. Автор принимал участие в изучении и обобщении литературы по теме диссертации, в постановке задачи, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных данных и формулировке выводов, написании и оформлении статей. Все представленные в диссертации результаты получены автором лично, либо при его непосредственном участии.

Основные результаты работы отражены в 7 статьях, 6 из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК.

1. Sergeeva, T. Yu. A Glucose-Responsive Polymer Nanocarrier Based on Sulfonated Resorcinarene for Controlled Insulin Delivery / T. Yu. Sergeeva, A. Y. Ziganshina, R. K. Mukhitova, I. R. Nizameev, M. K. Kadirov, A. S. Sapunova, A. D. Voloshina, T. A. Mukhametzhanov, I. S. Antipin // ChemPlusChem. – 2019. – 84. – 1560-1566. DOI: 10.1002/cplu.201900428.
2. Antipin, I. Design of molecular carriers based on sulfonated viologen cavitand for

- redox-induced substrate delivery / I. Antipin, P. Klypina, S. Sergeeva, A. Ziganshina, A. Sapunova, A. Voloshina // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2019. – 49 S1. – 145.
3. Sergeeva, T. Yu. Closed polymer containers based on phenylboronic esters of resorcinarenes / T. Yu. Sergeeva, R. K. Mukhitova, I. R. Nizameev, M. K. Kadirov, P. D. Klypina, A. Y. Ziganshina, A. I. Konovalov // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2018. – 9. – 1594–1601.
 4. Antipin, I. Glucose responsive polymeric nanocontainers for insulin delivery / I. Antipin, A. Ziganshina, T. Sergeeva, R. Mukhitova, I. Nizameev, M. Kadirov, A. Voloshina, V. Zobov // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2018. – 48 (Suppl. 1). – 159.
 5. Sergeeva, T. Yu. Application of ferrocene-resorcinarene in silver nanoparticle synthesis / T. Yu. Sergeeva, A. I. Samigullina, A. T. Gubaidullin, I. R. Nizameev, M. K. Kadirov, R. K. Mukhitova, A. Y. Ziganshina, A. I. Konovalov // *RSC Adv.* – 2016. – 6 – 87128–87133.
 6. Korshin, D. E. Electroswitchable self-assembly of tetraferrocene-resorcinarene / D. E. Korshin, N. V. Nastapova, S. V. Kharlamov, G. R. Nasybullina, T. Yu. Sergeeva, E. G. Krasnova, E. D. Sultanova, R. K. Mukhitova, Sh. K. Latypov, V. V. Yanilkin, A. Yu. Ziganshina, A. I. Konovalov // *Mendeleev Commun.* – 2013. – 23. – 71–73.
 7. Сергеева Т. Ю. Применение октакарбоксилата тетраферроценкаликс [4]резорцина в синтезе серебряных наночастиц / Т. Ю. Сергеева, Э. Д. Султанова, Р. К. Мухитова, И. Р. Низамеев, М. К. Кадилов, А. Ю. Зиганшина, А. И. Коновалов // *Изв. УфНЦ. РАН.* – 2014. – 3. – С. 94-97.

По материалам диссертации опубликованы тезисы 27 докладов на всероссийских и международных конференциях.

В тексте диссертации имеются ссылки на опубликованные автором работы. В диссертации отсутствует заимствованный материал без ссылки на автора и/или источников заимствования.

Специальность, которой соответствует диссертация. Выполненная Сергеевой Т. Ю. работа на тему «Наноконтейнеры на основе амфифильных резорцинаренов для управляемого связывания/высвобождения лекарственных средств и стабилизации наночастиц серебра» соответствует специальности 02.00.04 – Физическая химия (химические науки) в пунктах: 4. Теория растворов, межмолекулярные и межчастичные взаимодействия; 10. Связь реакционной способности реагентов с их строением и условиями осуществления химической реакции.

Расширенный научный семинар по направлению «Физическая химия» Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук» считает, что по актуальности, научной и практической значимости, достоверности полученных результатов, объему, целостности и законченности диссертационная работа Сергеевой Т. Ю. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата химических наук.

Заключение принято на заседании расширенного научного семинара по направлению «Физическая химия» (протокол № 3 от 01.10.2019 г.).

Присутствовали: 43 чел. Итоги голосования: «за» – 43, «против» – нет, «воздержавшихся» – нет.

Заключение рекомендовано к утверждению на заседании Ученого совета ИОФХ им. А.Е. Арбузова - обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН (протокол № 8 от 16.10.2019 г.). Из 25 списочного состава ученого совета присутствовали 21 человек.

Итоги голосования: «за» – 21, «против» – нет, «воздержавшихся» – нет.