

ВІДГУК ОФЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Мітіної Наталії Євгеніївни “Синтез поліпероксидів блочної та розгалуженої будови і супрамолекулярні структури на їх основі”, представлену на здобуття наукового ступеня доктора хімічних наук за спеціальністю 02.00.06 – хімія високомолекулярних сполук

Ідею про можливість створення “чарівної кулі”, яка б селективно доставляла лікарську речовину в хворі органи, тканини або клітини живого організму, висловив наприкінці XIX - початку XX століття німецький бактеріолог Пауль Ерліх. З тих пір у світі було запропоновано, досліджено, випробувано і, в багатьох випадках, доведено до комерційних терапевтичних форм широке коло носіїв лікарських субстанцій та біополімерів на основі низькомолекулярних природних і синтетичних поверхнево-активних сполук, полімерів, неорганічних речовин та полімер/неорганічних гібридів. Сьогодні над створенням ефективних носіїв конкретних лікарських препаратів, перш за все протипухлинної дії, працюють найкращі лабораторії світу в області хімії і фізики полімерів, біології, медицини та фармакології. В цих надзвичайно **актуальних** дослідженнях активну участь бере і кафедра органічної хімії Національного університету “Львівська політехніка” під керівництвом професора С.А. Воронова. Створена ним школа талановитих та відомих у світі хіміків-органіків-полімерщиків продовжує дивувати наукову спільноту майже невичерпними можливостями поліпероксидів у дизайні мультифункціональних полімерних носіїв складної архітектури. Гідним продовженням робіт цієї школи є і представлена до захисту докторська дисертація Мітіної Н.С., в якій була поставлена амбітна **мета** - встановити закономірності і розробити експериментальні методи синтезу нових поліпероксидів блочної та розгалуженої будови і на цій основі створити нові системи адресної доставки протипухлинних ліків і нуклеїнових кислот.

Важливі ідеї, стратегію і завдання роботи автор формулює у **Вступі** та літературному огляді, наведеному у **Розділі 1** дисертації. Тут зібрані, проаналізовані і систематизовані, перш за все, сучасні методи отримання кополімерів блочного типу з лінійною та гребенеподібною архітектурою, такі як контрольована радикальна полімеризація та методи прищеплення “grafting from”, “grafting to” і “grafting through”. Автор висвітлює переваги і недоліки кожного з цих методів і відзначає перспективність використання макроініціаторів полімеризації з

бічними і кінцевими пероксидними фрагментами для створення мультифункціональних полімерів складної розгалуженої будови. В літературному огляді обговорено також деякі властивості прищеплених та блок-кополімерів у розчинах (мікрофазове розділення, міцелоутворення, різні аспекти їх використання як носіїв для пасивної та активної доставки ліків), які найбільше цікавлять автора в його дисертаційній роботі. Наприкінці зроблено акцент на необхідності ретельних досліджень процесів самозбірки і морфології міцелоподібних структур в розчинах нових синтезованих полімерних носіїв, а також інкапсуляції ними фізіологічно активних речовин і ДНК.

Розділ 2 дисертації традиційно містить характеристики об'єктів дослідження, численні методики синтезу і аналізу преполімерів та кінцевих мультифункціональних поліпероксидів блочної і розгалуженої будови, методики створення композицій одержаних полімерних наноносіїв з ліпідами, протираковими препаратами і нуклеїновими кислотами, а також опис використаних фізико-хімічних методів дослідження. Цей розділ гарно структурований, чітко і систематично викладений, однак на жаль містить не всю інформацію, що необхідна для оцінки коректності розрахунків деяких величин та їх інтерпретації. Головним чином, це стосується занадто стислого опису окремих методів дослідження, що відображено у зауваженнях, однак навести в цій частині температури кипіння всіх використаних мономерів та концентрації ініціаторів (ко)полімеризації теж було б доцільно.

Розділ 3, який відкриває результативну частину дисертації, вражає розмахом синтезів та різнопланових кінетичних досліджень процесів бінарної, потрійної та прищепленої кополімеризації за участю мономерів неіоногенного (ВЕР, ГМА, NBP, NBK, NIPAM, BA, MMA), аніонного (АК) та катіонного (ДМАЕМ) типів. Крім визначення кінетичних параметрів реакцій кополімеризації, автор ретельно характеризує їх продукти за хімічним складом, мікроструктурою та молекулярною масою, що потребує тривалої кропіткої роботи, різноманітних методів аналізу (FTIR, УФ, ^1H і ^{13}C ЯМР спектроскопії, ГПХ, газорідинної хроматографії, елементного і функціонального аналізу тощо), а також численних розрахунків. В результаті, на першому етапі шляхом варіювання в широких межах складу мономерних сумішей доведена реальна можливість керування процесами бінарної і

потрійної кополімеризації та складом одержаних преполімерів для створення на їх основі гребенеподібних кополімерів. На другому етапі блискуче реалізовані всі можливі варіанти керованого синтезу розгалужених кополімерів з бічними ланцюгами різної природи і знаку заряду з використанням як полімераналогічних перетворень (“grafting to” методу), так і радикальної полімеризації, ініційованої пероксидними групами. Таким чином, було показано широкі межі молекулярного дизайну водорозчинних розгалужених кополімерів заданої внутрішньої будови і розподілу іоногенних груп та з необхідним рівнем гідрофільно-гідрофобного балансу.

Далі автор береться за синтези пероксидовмісних телехелевих полімерів і блок-кополімерів в органічних розчинниках з використанням окисно-відновних ініціюючих систем Ce^{4+} /спирт та Ce^{4+} /мПЕГ(ПЕГ) і проводить фундаментальні дослідження кінетики процесів (ко)полімеризації в присутності пероксидовмісного передавача ланцюга, а також хімічної будови і складу одержаних продуктів. Результати цих досліджень, виконані методами дилатометрії, гравіметрії, колориметрії, ГПХ, газорідинної хроматографії, FTIR та ЯМР спектроскопії, представлені у **Розділі 4** дисертації. Таким чином, автору вдається розробити цільовий синтез поверхнево-активних блок-кополімерів з контрольованими кількістю, положенням, довжиною і функціональністю полімерних блоків.

Найбільш цікавим є, на мою думку, **Розділ 5** дисертації, який присвячено колоїдно-хімічним та функціональним властивостям нових кополімерів блочної та розгалуженої будови як носіїв протиракових препаратів та нуклеїнових кислот. Шляхом вимірювання поверхневого натягу і електропровідності в розчинах кополімерів та їх композиції з лікарськими препаратами, а також застосування таких сучасних методів дослідження, як динамічне світлорозсіювання, SAXS, TEM, SEM, електронна і Рамановська спектроскопія, автор не тільки характеризує термодинамічні параметри міцелоутворення, розмір, морфологію, величину заряду (ζ -потенціал) і фрактальний характер утворених міцелоподібних структур, але й встановлює тонкі ефекти зміни будови фрактальних кластерів у розчинах (переходи від масово-фрактальних структур до поверхнево-фрактальних і навіть до суцільних твердих частинок) при варіюванні хімічної будови кополімерів. Це дійсно вражаючі результати, які можуть забезпечити тільки сучасні методи

структурного аналізу наночастинок у розчині і сучасна експериментальна техніка.

Логічною і красивою за своїми результатами є і остання частина роботи, описана в **Розділі 6** дисертації, де показані можливості практичного застосування нових функціональних полімерів на основі поліпероксидів в системах доставки ліків (Дох, Les-3120, Les-3661, КР-1019) та біологічно активних сполук (асОДН, плазмідної ДНК, короткої інтерферуючої РНК). За використання люмінесцентної мікроскопії та проведення численних біологічних досліджень *in vitro* та *in vivo* доведена біологічна сумісність і не токсичність розроблених наноносіїв та висока терапевтична активність інкапсульованих в них препаратів при дії на пухлинні клітини та трансформацію ДНК в клітинах ссавців, дріжджів та рослин.

Серед численних досягнень даної дисертаційної роботи найбільше **наукове значення** і найбільшу **новизну** мають, на мою думку, такі результати:

- Вперше запропоновано і успішно реалізовано синтез поліпероксидних макроініціаторів неіоногенного, катіонного, аніонного та змішаного типів з блочною лінійною і розгалуженою архітектурою в полярних органічних розчинниках за допомогою радикальних і полімераналогічних реакцій. На основі цих макроініціаторів розроблено і здійснено керований синтез різноманітних міцелоутворюючих кополімерів блочного типу в розчинниках різної полярності.
- Встановлено ефект підвищення реакційної здатності пероксидних груп в олігоелектролітних макроініціаторах аніонного та катіонного типів, що обумовлено впливом заряджених карбоксильних та аміногруп і розгорнутою (витягнутою) конформацією макроланцюгів. Це посилює контроль кінетики ініційованої ними прищепленої кополімеризації та макро- і мікроструктури отриманих гребенеподібних кополімерів.
- На основі систематичних досліджень процесів блок-кополімеризації з використанням окисно-відновних систем Ce^{4+} /спирт та Ce^{4+} /мПЕГ(ПЕГ), в тому числі в присутності пероксидовмісного передавача ланцюга, встановлено вплив природи відновника, концентрації окисно-відновної системи та температури полімеризації на ефективність і швидкість ініціювання, співвідношення між різними механізмами обриву радикалів та молекулярні параметри одержаних блок-кополімерів з кінцевим пероксидним фрагментом.
- Детально охарактеризовано процеси самозбірки нових прищеплених і блок-

кополімерів, морфологію, розміри і фрактальний устрій утворених ними у розчинах міцелоподібних структур в залежності від довжини, функціональності, заряду бічних ланцюгів та присутності в одній макромолекулі неіоногенних, поліелектролітних і, навіть, поліамфолітних блоків. Завдяки аналізу даних малоуглового рентгенівського розсіювання, а саме: одержаних значень фрактального розміру, встановлено існування більш щільного “ядра” в міцелоподібних структурах, що утворені прищепленими кополімерами із взаємодіючими бічними блоками [зокрема, полі(ВЕР-ко-ГМА)-*графт*-ПЕГ-*графт*-(НВР-ко-АК) порівняно з полі(ВЕР-ко-ГМА)-*графт*-ПЕГ].

- Встановлено складний механізм інкапсуляції ряду протипухлинних лікарських препаратів та нуклеїнових кислот міцелоподібними структурами гребенеподібних і лінійних блок-кополімерів. Показано, що в залежності від хімічного складу, будови, знаку і величини заряду на носіях процесу інкапсуляції ліків можуть розвиватися за рахунок гідрофобних взаємодій, водневих та/або сольових зв'язків та суттєво впливати на будову “ядра” і “корони” міцелоподібних структур.
- На основі детальних досліджень комплексоутворення нуклеїнових кислот з катіонними блок-кополімерами та розгалуженими поліамфолітами встановлено ефект компактизації кінцевих супрамолекулярних структур порівняно зі станом вільної ДНК та зміну знаку її ζ -потенціалу, що є визначальним для покращення взаємодії з мембранами клітин. На відміну від цього, при комплексоутворенні ДНК з розгалуженими та лінійними ПЕГ-вмісними блок-кополімерами утворюються продукти (поліплекси) суттєво більшого розміру.
- В результаті біологічних випробувань *in vitro* та *in vivo* створених систем доставки протипухлинних препаратів показано, що наноносії, основані на ПЕГ-вмісних гребенеподібних кополімерах, забезпечують суттєве зменшення побічних ефектів, які характерні для застосування вільних препаратів, а саме: проявів кардіо-, гепато- і нефротоксичності у лабораторних тварин. Крім того, використання таких носіїв дозволяє знизити до 10 разів терапевтичну дозу протипухлинних ліків і надає можливість долати бар'єр ретикулоендотеліальної системи тварин і резистентність пухлинних клітин.

Проведені дослідження та їх теоретичний аналіз довели продуктивність ідей

автора, покладених в основу роботи. Крім того, вони дали можливість реально створити цілий ряд нових наноносіїв протипухлинних препаратів та нуклеїнових кислот із заданими фізико-хімічними та колоїдно-хімічними властивостями. Подальше успішне біотестування розроблених систем, яке проводилось у співпраці з багатьма профільними інститутами НАН і НААН України, а також відомими науковими центрами Туреччини та Австрії, відкрило перспективи їх подальшого патентування і використання для вирішення різноманітних завдань пасивної та активної (внутриклітинної) доставки. В цьому полягає велике **практичне значенні** представленої дисертаційної роботи.

Серед помічених **недоліків** даної роботи слід відзначити наступні:

- Значне місце в роботі займають кінетичні дослідження процесів кополімеризації в бінарних та потрійних сумішах мономерів методом дилатометрії з визначенням загальної конверсії мономерів та швидкості кополімеризації. Для розрахунку першого параметру автор використовує так званий “середній коефіцієнт контракції для даних мономерів при даній температурі” (формула 2.1), однак не розшифровує, як він визначався у випадку кополімеризації бінарних і потрійних сумішей мономерів різного складу: ВЕП/ГМА, НВП/ВЕП/ГМА, НПМ/ВЕП/ГМА, НВК/ВЕП/ГМА. Між тим, як свідчать літературні дані, це не є простим питанням і для коректного розрахунку загальної конверсії мономерів в процесі кополімеризації навіть у бінарній суміші необхідно спочатку **експериментально** визначити коефіцієнт контракції у сумішах різного складу, оскільки цей коефіцієнт при фіксованій температурі суттєво залежить від природи мономерів та їх можливої взаємодії, від складу реакційної суміші та розчинника. Хотілося б отримати від автора роботи більш детальні відомості з цього приводу, тим більше що в досліджених ним процесах кополімеризації відбувалась з часом зміна складу мономерів у реакційній суміші.
- Дослідження кінетики розкладу пероксидних груп, що входили у склад прищеплених кополімерів полі(ВЕП-ко-ГМА)-*графт*-ПЕГ та потрійних ГФО, проводились у закритих ампулах за температур $T=110, 117, 122, 130$ та 150 °С, які перевищували температуру кипіння розчиннику – діоксану. Оскільки деталі цих експериментів та відомості про фізичний стан кополімерів за таких

температур і в присутності пароподібного “розчиннику” в роботі відсутні, хочеться запитати у автора, наскільки коректні знайдені ним в цих умовах закономірності розкладу пероксидних груп “в розчині діоксану” та їх обговорення? Чому б автору не дослідити процес розкладу пероксидних груп макроініціаторів саме за тієї температури розчину (80 °C), за якої відбувалась подальша прищеплена полімеризація мономерів СТ, БМА, НВП, ДМАЕМ, АК?

- Головну причину цікавого експериментального факту зростання швидкості відновлення іонів Ce^{4+} у водних розчинах мПЕГ з більшою ММ автор бачить у підвищенні довжини поліетерного ланцюга, завдяки чому “зростає їх здатність до координації катіонів Ce^{4+} ”. Але якщо згадати умови дослідження, а саме: однакову концентрацію у всіх випадках іонів окисника і гідроксильних груп мПЕГ ($[\text{Ce}^{4+}] = [-\text{OH}] = 0,02$ моль/л), стає очевидним, що масова концентрація речовини (етиленоксидних ланок) у розчині при збільшенні ММ від 550 до 5000 зростає майже у 10 разів і складає для мПЕГ₅₀₀₀ 10 мас %. Саме це, на мою думку, а не довжина ланцюга мПЕГ підвищує “координацію катіонів Ce^{4+} ” і швидкість їх відновлення в даному експерименті. Разом з тим, молекулярна маса мПЕГ безумовно повинна впливати на стійкість комплексу, який, як добре відомо з літератури, утворюють іони Ce^{4+} з гідроксильними групами і в результаті подальшого руйнування якого утворюється вільний радикал, однак цей важливий аспект залишився недослідженим в роботі.
- За умов проведення реакцій блок-кополімеризації, а саме: попереднього змішування у розчиннику мономеру, монопероксину та відновника (низькомолекулярного спирту або мПЕГ) і додавання в останню чергу солі Ce^{4+} , схеми основаних та можливих побічних процесів, представлені на стор. 155-158, є неповними. Вони повинні містити також конкурентні рівноваги комплексоутворення іонів Ce^{4+} з молекулами мономерів (такі дані є в літературі), гідроксильними групами мПЕГ або спиртів і, навіть, з молекулами води. Останнє підтверджують і дані представленої роботи (рис. 4.2, крива 1), які вказують на можливість ініціювання полімеризації мономерів самою сіллю Ce^{4+} у воді без спеціально доданого відновника. Але безумовно швидкість такого ініціювання є значно нижчою.
- Не можна погодитись з ідеєю автора стосовно дисоціації кінцевих гідроксильних

груп мПЕГ або ПЕГ у водному середовищі, яка нібито обумовлювала невеликий від'ємний заряд і “кисле” значення рН в розчинах прищепленого кополімеру полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-ПЕГ та *електростатичну* взаємодію його щеплень з позитивно зарядженими молекулами доксорубіцину гідрохлориду (стор.189-190). Простим поясненням такого результату може бути якість використаної в експериментах води (зазвичай, дистильована або бідистильована вода має “слабко-кисле” значення рН за рахунок розчиненої в ній вуглекислоти), однак нажаль будь-які відомості про воду як розчинник в роботі відсутні. Щодо водних розчинів самих мПЕГ або ПЕГ, то однією з можливих причин “кислого” значення їх рН є, як відомо, наявність певної кількості кінцевих –COOH груп, які утворюються внаслідок поступового окиснення спиртових груп при неналежному зберіганні полімерів. Втім, бічні ланцюги мПЕГ у прищепленому кополімері містять на кінці метоксигрупи, то про які “іоногенні” гідроксильні групи взагалі йде мова? Якщо автор має на увазі ті –ОН групи, що знаходяться на другому кінці щеплень близько до основного ланцюга (рис. 3.1), то вони взагалі екрановані і знаходяться в областях зі зниженою діелектричною проникністю.

- Інтерпретація дуже цікавих результатів SAXS досліджень в розділі 5 містить деякі неточності і помилки. Зокрема, фрактальний розмір (D_f) у степеневому режимі розсіювання Порода ($I \approx q^{-D_f}$), який автор позначає як “ a ”, не може бути вищим за 4,0. Це є граничне значення, яке відповідає розсіюванню рентгенівського світла суцільними твердими сферичними частинками з гладкою поверхнею. Між тим, автор на стор. 194 наводить некоректне значення фрактального розміру $a=4,6 \pm 0,1$. Далі, “плато”, про яке пише автор на стор. 194 і яким при малих значеннях вектору розсіювання q має закінчуватись режим розсіювання Порода, це не що інше як експоненціальний режим розсіювання Гін'є. Він є “межею обрізання” степеневому режиму розсіювання Порода і характеризує не “середній”, а максимальний розмір фрактальних агрегатів або кластерів.
- Автор неправильно позначає точки помутніння в табл. 5.12 як значення НКТР, котрі знаходять виключно з фазових діаграм відповідних систем полімер/розчинник.

- Робота містить також недоліки, пов'язані з оформленням дисертації. Зокрема, відсутня необхідна інформація про електроди та їх калібрування в метанолі при описанні методу потенціометричного титрування, не вказано тип реєструючого детектору в методі гель-проникної хроматографії (за показником заломлення чи світлорозсіюванням), не вказаний метод обробки даних динамічного світлорозсіювання, відсутній опис методики визначення концентрації іонів Ce^{4+} у розчині фотокolorиметричним методом, не наведені умови одержання кон'югатів кополімерів з Дох. В розділі 3 не наведені ММ прищеплених ланцюгів мПЕГ; багато фізико-хімічних величин, наведених в таблицях, не мають розшифровки в тексті або під таблицями.

Вказані зауваження та побажання мають переважно рекомендаційний характер і спрямовані лише на подальше узагальнення і осмислення результатів цієї гарної і буквально титанічної дисертаційної роботи. Якщо оцінювати докторську дисертацію Мітіної Н.Є. в цілому, слід окремо відзначити широту ідей і використаних підходів автора, завдяки чому вдалось не тільки розробити шляхи отримання, але й реально створити декілька каталогів носіїв лікарських препаратів та біополімерів, які можуть в подальшому “підбиратись” для вирішення конкретних завдань доставки в живому організмі. Поставлені завдання успішно реалізовані за допомогою вдало вибраних і взаємно доповнюючих фізичних і фізико-хімічних методів дослідження, що робить встановлені в роботі закономірності і зроблені висновки повністю **достовірними**. Дисертація виконана й викладена на високому науковому рівні, містить у кожному розділі гарний вступ, логічні переходи і чітке заключення; також, її результати перспективні для подальшого патентування з урахуванням вже оформлених 3-х патентів України. Отже, немає сумнівів, що дана дисертаційна робота є значним внеском в розвиток хімії і фізико-хімії високомолекулярних сполук, а також сучасних біотехнологій, наномедицини і фармакології.

Результати дисертації відображені в багатьох наукових публікаціях, серед яких: 3 розділи монографії, 30 статей у наукових фахових (вітчизняних і міжнародних) виданнях, 9 статей в інших періодичних виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз даних, та 3 патенти України. Публікації і автореферат повністю відповідають змісту дисертаційної роботи.

Вважаю, що дисертаційна робота Мітіної Наталії Євгеніївни “Синтез поліпероксидів блочної та розгалуженої будови і супрамолекулярні структури на їх основі” є завершеною науковою працею і за актуальністю та об’ємом проведених досліджень, новизною результатів, їх науково-теоретичним і практичним значенням та ступенем обґрунтованості висновків повністю відповідає вимогам до докторських дисертацій, визначених «Порядком присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», зокрема п.п. 10, 13, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., а її автор, Мітіна Наталія Євгеніївна, заслуговує присудження наукового ступеня доктора хімічних наук за спеціальністю 02.00.06 – хімія високомолекулярних сполук.

Офіційний опонент –
провідний науковий співробітник
кафедри хімії високомолекулярних
сполук хімічного факультету
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор хімічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України

Желтоножська Т.Б.

Підпис докт. хім. наук професора Желтоножської Т.Б. засвідчую:

