

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Звягина Андрея Васильевича на тему: «ПРИМЕНЕНИЕ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ И ЛАЗЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 — «Биофизика»

Создание новых фотолюминесцентных наноматериалов для биоимиджинга является важной фундаментальной задачей с большим потенциалом для широкого применения в медицинской практики. Особую актуальность данные материалы приобрели в связи с развитием эндоскопических методов не только для диагностики, но и для хирургии. Практическая значимость этого направления определяется отсутствием в настоящее время флуоресцентных маркеров оптимизированных для эндоскопических методов и позволяющих более точно проводить идентификацию патологических (онкологических) тканей на фоне здоровой ткани, что является важной научной проблемой нескольких разделов современной биофизики, включая медицинскую биофизику, биофизику клеток и тканей и т.д.

Несмотря на то, что флуоресцентные метки давно и успешно применяются в экспериментах с культурами клеток и даже тканей *in vitro*, существует целый ряд ограничений по использованию их *in vivo*. Во введении к диссертационной работе автор указал все ограничения существующих флуоресцентных меток: использования УФ излучения для их возбуждения; автофлуоресценция тканей; сильное рассеяние присущее биологическим тканям.

Для решения указанных задач автор диссертации предложил использовать целый спектр современных объектов наномира, включая: наноалмазы, нанорубины, апконверсионные наночастицы, наночастицы оксида цинка. Основные трудности при создании эффективных мультифункциональных систем связаны с необходимостью одновременного решения нескольких серьезных биофизических и биохимических задач. К ним

относится, прежде всего: 1) наличие вектора для адресной доставки с одновременной его защитой от ферментной биodeградации в живых системах (необходимо отметить, что ферментная биodeградация вектора всегда сопровождается «корона» эффектом, который и определяет характер биораспределения наночастиц [W.G. Kreyling, A.M. Abdelmonem, Z. Ali, F. Alves, M. Geiser, N.Haberl, R. Hartmann, S. Hirn, D.J.de Aberasturi, K. Kantner, G.Khadem-Saba, J.-M. Montenegro, J.Rejman, T. Rojo, I.R.de Larramendi, R.Ufartes, A. Wenk, W.J. Parak, In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles, Nature Nanotechnology, DOI: 10.1038/NNANO.2015.111]); 2) сохранение флуоресцентной метки; 3) возможность использования данного носителя для инкапсуляции биологически активных веществ. Создание таких систем открывает новые перспективы для реализации концепции тераностики (направление современной медицины, которая совмещает диагностические и терапевтические функции в одном объекте).

Выбор оптимальных нанообъектов, на базе которых, возможно реализовывать такие объекты, требует проведения системных исследований, позволяющих выявить закономерности процесса взаимодействия данных объектов с клетками с одновременной оптимизацией их фотолюминесцентных свойств и инкапсуляцией биологически активных веществ. В связи с этим *постановка задачи* диссертационной работы А.В. Звягина *обоснована*, а ее тема, несомненно, *актуальна* и важна и для теории и для практики, особенно для разработки основных концепций, методов и экспериментальной реализации функционального биомедицинского имиджинга.

Выполненная работа представляет собой системное исследование, в котором ставится и решается важная задача современной медицинской биофизики – имиджинг патологических тканей, а также систем доставки лекарств на клеточном, тканевом и системном уровне, используя, как инструмент решения задачи, последние достижения нанотехнологий – такие объекты, как наноалмазы, нанорубины, антистоксовых нанофосфоров, наночастицы оксида цинка.

Системность работы определяется сочетанием большого числа экспериментальных и расчетных методов исследования для обеспечения необходимых параметров флуоресценции, адресности доставки с сохранением возможности инкапсуляции биоактивных веществ, кроме того автор большое внимание уделяет изучению бисовместимости используемых наноносителей, и результаты данной работы внесли значительный вклад в получение знаний в новом направлении современной биофизики и медицины – нанотоксикологии.

Основные результаты, полученные автором и имеющие принципиальную научную новизну, состоят в следующем:

- разработаны методы создания наноалмазов для биоимиджинга. Показано, что химическая обработка поверхности наноалмазов позволяет изменять квантовый выход флуоресценции. Так оксидирование поверхности наноалмазов увеличивает данный параметр, а гидrogenизация уменьшает;
- получены нанорубины двумя методами, реализующими принцип «сверху-вниз» (шаровая мельница и абляция), и показана возможность их использования в качестве флуоресцентных агентов демонстрирующих максимально возможный контраст при биоимиджинге. изучены особенности поверхностного заряда наночастиц нанорубинов в воде и буферах.
- получено рекордное значение коэффициента конверсии для антистоксовых нанофосфоров за счет увеличения концентрации допирующей примеси;
- наночастицы оксида цинка дают контрастные изображения при облучении фемтосекундными импульсами, несмотря на низкий квантовый выход;
- показана возможность комбинации наноалмазов и антистоксовых нанофосфоров и проведено сравнительное исследование иммунно-химических свойств молекулярных адапторов;
- показана возможность зондирования рака молочной железы, используя биконъюгаты антистоксовых нанофосфоров;

Указанные новые закономерности и эффекты, в совокупности с предложенными конкретными экспериментальными методиками, реализованными как на модельных, так и реальных объектах, в частности для биоимиджинга, а также для исследования рецептор зависимого эндоцитоза наночастиц, что определяет *практическую значимость* данной работы. Работа была поддержана правительством РФ в рамках 220 постановления правительства (Договор №14.Z50.31.0022 от 19 марта 2014 года), а ее автор является научным руководителем лаборатории оптической тераностики в Нижегородском государственном университете (<http://www.opt-theranostics.unn.ru/index.php/ru/>).

Комплексный, системный и многоплановый подход к решению поставленной задачи, широкий спектр современных методов исследования, а также соответствие результатов, полученных разными методами являются основой *высокой степени обоснованности и достоверности полученных автором научных положений, выводов, рекомендаций и новизны результатов.*

Работа изложена на 209 страницах, содержит 60 рисунков и 2 таблицы. Все 7 глав диссертации и приложение написаны логично, ясно, хорошим языком, содержат постановку задачи, лаконичные заключения. Результаты в таблицах в подавляющем большинстве представлены в соответствии с требованиями ИСО. Обзор литературы отличается системностью анализа литературных данных, их критическим обсуждением и постановкой задач исследования.

Замечания и вопросы, которые можно сделать по данной работе не носят принципиального характера и могут быть квалифицированы как пожелания.

1. Автор работы описывает универсальную платформу биконъюгации, в основе которой лежит модульный принцип. Одним из важных модулей данной системы является нацеливающая биомолекула, характеризующаяся высокой аффинностью к рецепторам клеток – мишеней. Хотелось бы услышать от автора работы комментарии об

устойчивости данного модуля к биодegradации за счет действия ферментов, а также о неспецифическом взаимодействии белков плазмы крови («корона» эффект - определяющий последующий характер биораспределения наночастиц) с модульными системами для тераностики.

2. Из текста работы не совсем понятно проводились ли исследования гемосовместимости нанообъектов, которые обычно предваряют *in vivo* эксперименты. Если такие эксперименты проводились, то как химический состав наночастиц влияет на их гемосовместимость?
3. Стр. 94. 4.2.3. Коллоидная стабильность нанорубинов и нанокорундов. Автор диссертации пишет, что отличительно чертой стабильных коллоидов является наличие дзета потенциала у частиц превышающее 20 мВ по модулю. Но, согласно общепризнанным данным, пороговым значением дзета потенциала характеризующие стабильные во времени коллоиды является значение 30 мВ. [http://www.soci.org/~media/Files/Conference%20Downloads/2011/Secrets%20of%200Formulation%20III%20Nov%202011/John_Duffy.ashx]. Необходимо отметить, что большинство наночастиц рассматриваемых в работе имеет дзета потенциал выше 30 мВ по модулю.
4. Стр. 95, рисунок 4.4. Хотелось бы получить объяснение причин более высокой агрегативной устойчивости коллоидов нанорубинов, оксида цинка, оксида титана по сравнению с наноалмазами. Автор сравнивал данные о гидродинамическом размере наночастиц в воде и в PBS буфере, хотелось бы услышать комментарии автора о том, как изменится дзета потенциал и размер частиц в плазме крови вследствие взаимодействия поверхности наночастиц с белками плазмы крови;
5. Стр 141, раздел 6.2.4 . В работе использовалась методика восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания для количественной оценки локальной диффузии. В работе для фотообесцвечивания использовались

мощности более 100 Вт, проводились ли контрольные эксперименты по воздействию на кожу таких плотностей мощности лазерного излучения?

Замечания по оформлению

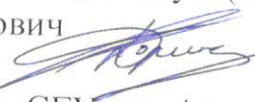
1. Традиционно, ссылки нумеруются в порядке их использования. В данной работе введение на первой страницы начинается со ссылки [63].
2. Часть рисунков содержит подписи на английском языке, например рис.1.11 (стр.39), рис. 4.4. (стр.95), рис.4.9 (стр.105), рис.5.1 (стр.110)
3. Ряд сокращений используется без расшифровки

Предложенные методы, подходы и полученные результаты могут быть использованы при чтении лекций и в научно-исследовательской работе в Московском, Нижегородском, Саратовском, Казанском, Томском государственных университетах, РХТУ (Москва), Санкт-Петербургском и Томском политехническом институте, Московском физико-техническом институте, Институте биоорганической химии им. академиков Шемякина и Овчинникова, Национальном медицинском исследовательском радиологическом центре Министерства здравоохранения РФ, а также других научных и отраслевых учреждениях, деятельность которых связана с использованием наночастиц для биоимиджинга.

Содержание диссертации полностью отражено в автореферате и соответствует указанной специальности. Автореферат дает полное представление о вкладе автора, новизне и значимости результатов. Основные результаты работы изложены в 69 печатных изданиях. Хочется отметить очень высокий уровень журналов в которых были опубликованы результаты работы, например Nature Nanotechnology, Small, Chemical Communications, которые показывают уровень работы, актуальность и признание мировым научным сообществом. Работа прошла апробацию на международных и всероссийских конференциях самого высокого уровня, причем большинство докладов были либо приглашенными, либо пленарными, что свидетельствует о высокой квалификации автора работы.

Все выше изложенное позволяет сделать заключение, что по актуальности решаемых задач, научной новизне и значимости основных положений и выводов, практической полезности достигнутых результатов рассматриваемая диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 и может рассматриваться как завершенная научно- квалификационная работа, в которой разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, имеющее существенное значение для развития теории и практики функционального биомедицинского имиджинга на основе фотолюминесцентных нанотехнологий, ее автор – Звягин А.В. – заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Зам. директора Института наноструктур и биосистем, профессор кафедры физики полупроводников факультета нано- и биомедицинских технологий ФГБОУ ВПО "Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского", доктор химических наук (02.00.04 – физическая химия), доцент Горин Дмитрий Александрович



Почтовый адрес: 410012, г. Саратов, СГУ, ул. Астраханская, 83
 Телефон: +7 (8452)511181
 Электронная почта: gorinda@mail.ru

