

"УТВЕРЖДАЮ"  
Заместитель директора по научной работе  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института биохимии  
и физиологии растений и микроорганизмов  
Российской академии наук



Т.С.В. профессор

Л.Ю. Матора

12 декабря

2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ  
на диссертацию Яценка Алексея Михайловича  
«Наноструктурированные многофункциональные системы  
для доставки и детектирования биологически активных веществ»,  
представленную на соискание ученой степени доктора  
физико-математических наук, по специальности  
03.01.02 – Биофизика

В настоящее время тераностика является одной из интенсивно развивающихся областей современной медицины, направленной на решение комплекса терапевтических и диагностических задач за счет создания систем, сочетающих функции доставки лекарств с сенсорными функциями. Комбинация адресных систем доставки терапевтических агентов и средств диагностики позволит реализовать не только раннюю диагностику заболеваний, но и их своевременную терапию. Характерной чертой современных технологий диагностики и терапии является их минимальная инвазивность. В этой связи использование оптического излучения в «окне прозрачности» биоткани позволяет реализовать возможность неинвазивного контроля важных биохимических параметров во времени и пространстве, а также интеграцию с оптическими и оптоэлектронными системами, что перспективно для исследования воздействия света на наноструктурированные материалы в биологических объектах. Благодаря высокой чувствительности и спектральной избирательности метод гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР) является мощным аналитическим инструментом, который находит все большее применение в биомедицинских исследованиях.

Весьма перспективным классом материалов для тераностики являются нанокompозиты, которые подходят не только для инкапсулирования, доставки и высвобождения биологически активного вещества, но также для мониторинга ближайшего окружения, в том числе, методом ГКР. Использование эндогенных биологических стимулов или оптического

излучения является перспективным для контролируемого высвобождения веществ *in vivo*.

Актуальность настоящей диссертационной работы связана с разработкой многофункциональных систем, позволяющих сохранить биохимическую активность инкапсулированных терапевтических агентов, а также реализовать их направленную доставку и визуализацию в организме.

Диссертационная работа Ященка А.М. состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованных источников (604 наименования), приложения и списка сокращений. Диссертация изложена на 274 страницах, содержит 97 рисунков и 4 таблицы.

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована её цель и основные задачи, описаны научная новизна и практическая значимость работы, приведены основные положения и результаты, выносимые на защиту, описано краткое содержание, структура и объем диссертации, апробация работы и личный вклад автора.

Первая глава посвящена аналитическому обзору литературы. Рассмотрены многофункциональные микрочастицы и микрокапсулы применительно к созданию эффективных систем доставки биологически активных веществ и сенсорных структур. Описаны основные методы капсулирования веществ в объем микрочастиц и микрокапсул, в том числе, за счет изменения условий микроокружения (рН, ионная сила, температура), где находятся микрокапсулы, а также способы высвобождения молекул из объема микрокапсул различными воздействиями (рН, ионная сила, воздействие ультразвука, лазерное излучение, ферментативная деградация). Рассмотрены перспективные направления использования микрочастиц и микрокапсул для биомедицинских приложений, в частности, для внутриклеточного транспорта биоактивных молекул (пептиды, ферменты, ДНК) в иммунологии, изучения активности нейронов и стволовых клеток, терапии онкологических заболеваний, медицинской диагностики, а также дистанционного измерения локальной температуры в структурах на основе плазмонно-резонансных наночастиц.

Во второй главе рассмотрены существующие методы создания высокоэффективных структур для высокочувствительной детекции ГКР. Обсуждаются основные направления их использования для биомедицинских приложений, а именно, для внутриклеточного обнаружения молекул, воздействия антибиотиков на культуру клеток, мониторинга изменения рН внутриклеточного пространства при эндоцитозе наночастиц, распознавания конформационных изменений молекул мембранных белков, визуализации клеточной мембраны, *in vivo* детектирования глюкозы, распознавания клеток злокачественных опухолей и идентификации микроорганизмов (бактерий).

В главе 3 продемонстрирован подход для капсулирования низко- и высокомолекулярных веществ в индивидуальные многокомпонентные



микроносители. Ультразвуковое воздействие на данные многокомпонентные носители приводит к разрушению липосом и выходу молекул субстрата, которые взаимодействуют с молекулами фермента в объеме микрочастиц карбоната кальция (ватерита). Локализация фермента в порах микрочастиц ватерита замедляет время протекания ферментативной реакции в многокомпонентных носителях на их основе по сравнению с аналогичной реакцией в многокомпонентных микрокапсулах, где фермент не локализован в порах.

В четвертой главе автором проведено исследование влияния числа биоразлагаемых полиэлектролитных слоев, наличия и порядка синтетических полиэлектролитов в оболочках микрокапсул, а также концентрации протеолитического фермента (проназы) на время разложения оболочек микрокапсул. Проведено капсулирование фермента L-аспарагиназы в микрочастицы ватерита с последующим формированием оболочек микрокапсул из биodeградируемых полиэлектролитных слоев. Показано, что микрокапсулы позволяют сохранить активность фермента, по сравнению с тем случаем, когда ферменты находятся в свободном состоянии. Полученные результаты могут стать основой для оптимизации терапии лейкемии терапевтическими ферментами, например, L-аспарагиназой.

Пятая глава посвящена разработке структур ГКР на основе коллоидных частиц, а также на поверхности пористых материалов, и их использование для регистрации ГКР спектров мембраны эритроцитов, мониторинга химических реакций и обнаружения биологически активных веществ. Применен подход к регистрации спектров ГКР от молекул, входящих в структуру плазматической мембраны эритроцитов с использованием золотых наночастиц. Предложена структура ГКР для *in situ* мониторинга химической реакции, в которой тиольные группы молекулы 4-нитротиофенола связываются с поверхностью золотой наноболочки, сформированной на микрочастицах диоксида кремния.

В главе 6 приводится описание разработанной автором структуры на основе микрочастиц диоксида кремния, покрытых наноструктурированной оболочкой, содержащей одностенные углеродные нанотрубки и наночастицы золота, в качестве универсальной платформы для детектирования биологически активных веществ методом ГКР, для использования в качестве КР метки, а также для получения микрокапсул и контрастных агентов для фотоакустической спектроскопии.

Диссертацию завершает информативное заключение, содержащее основные результаты работы и их обобщенную оценку, а также приложение, в котором приводится описание материалов и детали экспериментов, методики получения образцов и использованные методы их характеристики.

Среди основных результатов диссертационной работы следует выделить следующие:

- с использованием метода полиионной сборки были сформированы многокомпонентные и мультифункциональные носители. Проведены эксперименты по оптимизации структуры указанных носителей путем варьирования их состава и условий получения. Таким образом, были сформированы многокомпонентные микрореакторы типа липосомы/пористые микрочастицы карбоната кальция, содержащие в порах иммобилизованный фермент. Ферментативная реакция в данных системах была инициирована путем разрушения липосом ультразвуковым излучением.

- установлено, что для сохранения полной терапевтической активности L-аспарагиназы в объеме микрокапсул, оболочка которых сформирована из биоразлагаемых полиэлектролитов, концентрация динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты для растворения темплатной частицы карбоната кальция не должна превышать 20 мМ.

- показано, что на скорость ферментативной деградации оболочек микрокапсул, состоящих из биоразлагаемых полиэлектролитов полиаргинин/полиаспарагин, оказывает влияние число полиэлектролитных слоев в структуре оболочки, наличие и порядок недеградируемых синтетических полиэлектролитов и концентрация протеолитического фермента.

- предложен подход к созданию ГКР платформ на основе нетканых биосовместимых нановолокон хитозана, содержащих наночастицы золота. Установлена зависимость степени заполнения и распределения золотых наночастиц в структуре нановолокон от концентрации золотохлористоводородной кислоты.

- разработаны новые платформы ГКР типа «ядро-оболочка», представляющие собой следующие комбинации: пористые микрочастицы ватерита/наночастицы золота и микрочастицы диоксида кремния/одностенные углеродные нанотрубки/наночастицы золота. Продемонстрирована роль включения одностенных углеродных нанотрубок в структуру платформ ГКР и показано их взаимодействие с наночастицами золота, что позволяет реализовать в структуре области с локальным максимумом электромагнитного поля и проводить отображение (картирование) платформ ГКР по характерной линии КР. Показана возможность определения степени нагрева таких структур путем измерения стоксовой и антистоксовой компонент спектра КР от одностенных углеродных нанотрубок, а также определены предельные плотности мощности лазерного излучения для сохранения целостности ГКР платформы. Исследована возможность использования полученных ГКР платформ и микрокапсул на их основе в качестве контрастных агентов в



фотоакустической спектроскопии и проведена их *in vitro* визуализация в воде и в крови.

Разработанные в работе подходы и методики позволили создать полиэлектролитные системы в виде микросфер для капсулирования терапевтического фермента с сохранением его биохимической активности. Разработанный способ построения многокомпонентных носителей расширяет возможности для загрузки различных биологически активных веществ в микросферы.

Подходы к получению структур для детекции ГКР послужат базой для создания воспроизводимых и стабильных сенсоров ГКР для обнаружения веществ без использования специальных меток. Сферические микроструктуры, содержащие углеродные наноструктуры в виде одностенных нанотрубок и золотые наночастицы, перспективны для оптической визуализации в биологических системах. Результаты по исследованию нагрева данных структур лазерным излучением будут способствовать развитию таких направлений, как лазерная гипертермия, фотоиндуцированная трансфекция веществ через биологические мембраны, а также теоретическое и экспериментальное изучение нагрева металлических наночастиц и превращение лазерного излучения в тепло в наноструктурированных объектах.

Необходимо отметить, что диссертационная работа выполнена при поддержке нескольких зарубежных и российских научных фондов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современных методов исследования, использованием традиционных методик анализа полученных данных и воспроизводимостью результатов. Основные результаты работы прошли оценку независимых рецензентов с последующим опубликованием в высокорейтинговых международных научных журналах. Полученные результаты находятся в соответствии с результатами других авторов и научно-исследовательских групп. По материалам диссертации опубликовано 33 научные работы в изданиях, включенные в перечень рекомендованных ВАК, и 2 учебно-методических пособия. Основные результаты работы были представлены на научных семинарах, научных школах, всероссийских и международных конференциях, из них 13 устных докладов на конференциях и научных школах, пять из которых приглашенные. Автореферат соответствует содержанию диссертации и полностью отражает её результаты.

Полученные Ященком Алексеем Михайловичем результаты являются примером использования достижений современного материаловедения, фотоники и плазмоники для решения целого спектра биофизических задач, в частности, доставки и мониторинга биологически активных веществ на клеточном уровне. Кроме того, результаты работы будут полезны в учебном процессе при чтении учебных курсов. Результаты представленных в

диссертации исследований рекомендуются к использованию в институтах и университетах, занимающихся изучением различных аспектов самоорганизации органических веществ и наноматериалов, синергетических эффектов в наноматериалах, взаимодействия наноматериалов с биологическими системами: в Саратовском государственном университете, в Московском государственном университете, в Институте биофизики клетки РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН и др.

Положительно оценивая рецензируемый научный труд в целом, необходимо сделать ряд замечаний:

- в главе 1 обсуждаются механические свойства полиэлектролитных микрокапсул. Однако хотелось бы иметь представление о стабильности микрокапсул в различных средах, например, вода, физиологический раствор, питательная среда, сыворотка.

- в работе не приводятся данные об исследовании токсичности используемых материалов и структур на их основе, в особенности, при работе с клеточными линиями.

- для создания структур ГКР автор использует золотые наночастицы в качестве усилителей электромагнитного поля, однако известно, что максимальное усиление наблюдается на серебряных наночастицах. Чем обусловлен выбор золотых наночастиц в качестве усиливающей среды для неупругого рассеяния?

- во второй главе приводится информация о зависимости фактора усиления различных структур ГКР и актуальные на настоящий момент методики расчета усиления структур ГКР. Однако нет упоминания о важной проблеме метода ГКР, а именно, что перенос энергии зависит от типа связи с зондом (ковалентная, ионная и т. д.).

- имеются многочисленные погрешности в оформлении работы, связанные с наличием грамматических, стилистических, логических ошибок, некорректных формулировок.

Указанные выше замечания не имеют принципиального значения, не снижают научных достоинств работы и не влияют на содержательную часть выводов и защищаемых положений.

Диссертация Яценка Алексея Михайловича «Наноструктурированные многофункциональные системы для доставки и детектирования биологически активных веществ» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой предлагаются подходы и инструменты для решения задач, характерных для следующих разделов биофизики: биофизика клетки и биофизика клеточных мембран, медицинская биофизика.

По актуальности, содержанию представленных материалов, новизне и научно-практической значимости полученных данных, диссертационная работа соответствует всем требованиям п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением



Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Яценко Алексей Михайлович, заслуживает присуждения учёной степени доктора физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на заседании лаборатории нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, протокол № 6 от 21 ноября 2016 г.

Отзыв составил:

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории нанобиотехнологии  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института биохимии и физиологии  
растений и микроорганизмов  
Российской академии наук  
(ИБФРМ РАН)



Богатырев Владимир Александрович

28 декабря 2016 года  
410049 г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13  
E-mail: bogatyrev\_v@ibppm.ru  
Тел. 8(8452)970403

Подпись Богатырева В.А. заверяю  
Ученый секретарь ИБФРМ РАН  
к.б.н.



Пылаев Т.Е.