

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию Алексея Михайловича Яценка «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**

Современное состояние молекулярной медицинской диагностики позволяет измерять сотни параметров, характеризующих активность ферментов, рецепторов, состояние других мембранных белков, концентрации сигнальных белков и метаболитов клетки. Переход медицины на персонифицированный уровень требует совершенствования всего арсенала биоаналитических измерений и средств доставки лекарственных препаратов. Одним из стратегических направлений развития такого рода является обеспечение комплексного диагностического, терапевтического воздействия и обеспечивающего последующий мониторинг лечебного эффекта с использованием единой нано- или микроструктуры. Комплексное воздействие достигается за счет использования эффектов быстрой и мультиплексной молекулярной нанодиагностики, направленной доставки лекарственных препаратов и других воздействий с возможностью регулируемой реализации терапевтического эффекта и эффектов управления в режиме реального времени.

Учитывая сказанное выше, можно утверждать, что тема диссертационной работы Алексея Михайловича Яценка «Наноструктурированные многофункциональные системы для доставки и детектирования биологически активных веществ» представляется вполне актуальной и направлена на решение одной из важнейших задач развития персонифицированной медицины.

В соответствии с выбранной темой соискатель исследовал возможности новых подходов построения структур «ядро-оболочка» и микрокапсул, оболочка которых чувствительна к внешнему воздействию с целью их одновременного использования для инкапсулирования, доставки и высвобождения биологически активных веществ, а также в качестве сенсоров. В рамках диссертационной работы были сформулированы и решены следующие задачи:

- разработка подходов для построения многокомпонентных носителей методом последовательной адсорбции с целью инкапсулирования нескольких биологически активных компонентов и проведения ферментативной реакции в объеме носителей;
- исследование влияния количества полиэлектролитных слоев, типа полиэлектролита и их последовательности в структуре оболочек микрокапсул на скорость разложения биodeградируемых микрокапсул при действии протеолитических ферментов;
- инкапсулирование модельного фермента в объем биоразлагаемых полиэлектролитных микрокапсул и исследование его протеолитической и температурной стабильности;
- разработка новых подходов к построению сенсоров на основе эффекта ГКР с использованием микрочастиц карбоната кальция, диоксида кремния и биосовместимых нетканых нановолокон хитозана и экспериментальное исследование применения полученных структур в качестве систем обнаружения биологически активных веществ методом ГКР, контрастных агентов для фотоакустической спектроскопии и других биофизических приложений.

Работа содержит следующие основные разделы: введение, обзор литературы (2 главы), результаты и их обсуждение (4 главы), приложения (16 глав), описывающие методики и используемое оборудование, а также заключение и благодарности. Кроме того, диссертация содержит список используемых сокращений, список цитируемой литературы, содержащий 604 ссылки. Работа изложена на 274 страницах, содержит 97 рисунков и 4 таблицы. Материалы диссертации изложены в 33 статьях в рецензируемых журналах (в 8 из них диссертант является первым автором) и в 7 статьях в сборниках (в 5 из них диссертант является первым автором). Диссертант является соавтором двух методических пособий.

**Введение** посвящено формулировкам актуальности, цели и задач диссертации. В этой главе отражены научная и практическая значимость работы, личный вклад автора, а также структура, объем диссертации и положения,

выносимые на защиту. Написана чётко и ясно. Вместе с тем, встречаются и спорные формулировки, и откровенные опечатки. Так на стр.12 читаем: «... Установлено, что концентрация **растворителя** этилендиаминтетрауксусной кислоты не более 20 мМ ...». Очевидно, что ЭДТА это не растворитель. Далее: «...в микрокапсулы с разным числом биоразлагаемых полиэлектролитов в структуре оболочек микрокапсул ...». Пропущено слово «слоев». На той же стр.12 видим: «... Установлена **зависимость** концентрации золотохлористоводородной кислоты **на заполнение и распределение** ...». На стр.13 обнаруживаем странную фразу: «... Исследование сохранения протеолитической и **температурной активности терапевтического фермента** ...». Что такое температурная активность фермента? Что такое терапевтический фермент?

Однако отмеченные неточности не портят общего позитивного восприятия этого раздела диссертации.

Глава 1 литературного обзора представляет собой текст, отражающий современное состояние в области получения, исследования свойств и применению многофункциональных микрочастиц и микрокапсул. Эта часть работы показывает высокий уровень информированности автора в упомянутой выше области и демонстрирует способность Алексея Михайловича и выделять важнейшие точки развития анализируемого направления. В этой части литературного обзора наряду с огромным объемом проанализированной автором литературы бросается в глаза большое количество опечаток и с большим трудом читаемых предложений. Ниже приведены некоторые из них.

- Стр. 21. «... Микрокапсулы, полученные на микрочастицах полистирола и меламина формальдегид, имеют аналогичные параметры диоксида кремния...»;

- Стр. 25. «... Незавершённая внешняя электронная оболочка в наночастицах приводит к возникновению локального поверхностного плазмонного резонанса в видимой области...» - спорное утверждение;

- Стр.26. «Кроме оптических свойств наночастицы серебра интересны в силу антибактериальных свойств»;

- Стр. 26. «...Интересно, что получение нестабилизированных наночастиц может быть остановлена в определенный промежуток времени...»;

- Рис 1.6. «...методом конфокальное сканирующей микроскопи...»;

- Стр. 27. «...при воздействии поля постоянного магнита...», «...Интересный подход перемещения живых клеток в клеточной среде и адгезированных на подложке с помощью магнитных микрокапсул было предложено в работе...»;

- Стр. 28. «...Красители, чье поглощение лежит в ближней ИК области применяют по аналогии с металлическими наночастицами...»,

«...квантовые точки в силу своих оптических свойств обладают довольно высокой стабильностью, высоким квантовым выходом и узким пиком люминесценции...» - очень спорное утверждение;

- Стр. 29. Рис. 1.7. рисунок из своей же работы, для литературного обзора это странно;

- Стр. 32. «...Для метод преципитации в основном используют...», «...Адсорбция, еще один метод для инкапсуляции, в котором молекулы адсорбируют на...», «...преимуществом фосфата кальция является его биоразложение...»;

- Стр. 33. «...В основе данного метода загрузки лежит использование различных растворителей, которые способны максимально растворять то или иное вещество и достигать необходимой загрузки молекул...» - довольно невнятное объяснение метода замены растворителей;

- Стр. 35. Что такое фотокислоты? В чем разница методов температурного воздействия и термохимического?

- Используются неверные термины глютаровый альдегид и пегулированный;

- Стр. 37. «...захват микрокапсул происходит фагосомальной структурой с отсутствием микрокапсул в цитозоле...»;

- Стр.43. Не вполне ясен термин «биологическое воздействие», при введении микрокапсул организмы и отдельные клетки все сводится к химическим процессам разрушения оболочки.

Небрежность в изложении приводит к ошибочной интерпретации литературных данных. Так при обсуждении работы [106] (стр.35) автор говорит о повышении  $T_m$  ПЭ системы, в то время как в работе речь идет о переходе состояния системы через величину  $T_m$  ПЭ системы. А это две большие разницы. Совершенно разные последствия! Большой минус автору.

Некоторые части этой главы написаны очень схематично (раздел 1.5.2. и 1.5.6.) и практически представляет собой набор названий разделов с двумя или тремя предложениями и перечислением ссылок на литературные источники. Довольно странно выглядит объединение в одной главе материала по влиянию электрического поля и механических воздействий (раздел 1.5.4.).

В тоже время заключение главы 1 логически выверено и является самой понятной и четко изложенной частью.

В главе 2 литературного обзора описаны разнообразные платформы на основе эффекта гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) и их применение. В этой главе были рассмотрены перспективные типы структур на основе наночастиц золота и серебра для создания сенсоров ГКР. Рассмотрены наиболее перспективные направления применения сенсоров ГКР для биофизических и биомедицинских приложений. Глава написана хорошим языком, читается легко и практически не содержит опечаток. В плане небольшого замечания к содержанию главы хотелось бы отметить отсутствие ссылок в разделе, описывающем механизмы реализации эффекта ГКР.

В ходе изложения обзора литературы автор ссылается на 15 своих работ. Это достаточно необычно, но коль так, то где же ссылки на остальные 27 – они получается чем-то хуже.

Глава РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ посвящены изложению и обсуждению результатов решения основных задач работы. Последовательность изложения результатов работы соответствует поставленным задачам.

В главе 3 диссертации автором предложен подход к формированию многокомпонентных носителей за счет электростатического взаимодействия между внешними слоями полиэлектролитов в структуре оболочек нано- и микроносителей. Проведено детальное исследование влияния материала микроносителя, ионной силы, и концентрации нано- и микроносителей на степень заполнения и агрегацию многокомпонентных носителей. Предложенный Алексеем Михайловичем метод позволил провести инкапсуляцию субстрата и фермента в один носитель и использовать объем носителей в качестве микрореактора ферментативной реакции. Можно ожидать, что предложенный автором подход будет эффективен для формирования многокомпонентных носителей с возможностью инкапсуляции низко- и высокомолекулярных (гидрофобных/гидрофильных) веществ в один носитель, а также для проведения биохимических реакций в ограниченном объеме.

В главе 4 приведены результаты экспериментальных исследований влияния количества биоразлагаемых полиэлектролитных слоев, наличия недеградируемых синтетических полиэлектролитов в оболочках микрокапсул, и концентрации фермента на время разложения микрокапсул при действии протеолитических ферментов. Установлено, что разложение оболочек микрокапсул замедляется при увеличении количества биоразлагаемых полиэлектролитных слоев и при включении недеградируемых синтетических полиэлектролитов в структуру оболочки.

Автором диссертации предложен подход растворения ядер карбоната кальция путем диализа в растворе ЭДТА, который позволяет сохранять 100% активность L-аспарагиназы. Проведено инкапсулирование L-аспарагиназы в биоразлагаемые микрокапсулы, что позволило сохранить активность фермента и повысить его устойчивость к действию протеаз. Автором предполагается, что инкапсулированный фермент будет устойчив к действию протеаз не только *in vitro*, но и *in vivo*.

В главе 5 автор описывает разработку оригинальной биоаналитической платформы на основе эффекта ГКР, использующую золотые нанооболочки на

микрочастицах диоксида кремния. Проведен мониторинг каталитического восстановления молекул 4-нитрофенола до 4-аминофенола в режиме реального времени. Установлено, что сдвиг колебаний нитро групп на спектрах ГКР в сторону коротких волновых чисел и отсутствие на спектрах колебаний азотных компонентов свидетельствует о мономолекулярном характере реакции. Анализ спектров ГКР позволил установить взаимодействие агрегатов золотых наночастиц с плазматической мембраной эритроцитов, в частности с молекулами гликокаликса, которые встроены в двойной липидный слой мембраны, а также с липидным слоем мембраны.

В этой же части работы автором разработан подход для формирования структур ГКР на основе пористых материалов, в частности пористых микрочастиц карбоната кальция и биосовместимых нетканых нановолокон хитозана, полученных методом электроформования. Показано, что количество и распределение золотых наночастиц в структуре карбонатных ядер и нановолокон хитозана может контролироваться за счет варьирования циклов адсорбции наночастиц золота и за счет концентрации прекурсора. Проведена оценка эффективности структур ГКР на основе нетканых нановолокон. Показана возможность обнаружения родамина бЖ и глюкозы. Обнаружено, что пористая структура микрочастиц карбоната кальция оказывается предпочтительной как для получения областей с локальным максимумом электромагнитного поля при адсорбции золотых наночастиц в структуру ядер, так и для неспецифического обнаружения биологически активных веществ.

В главе 6 описаны платформы, использующие эффект ГКР на основе наноструктурированных оболочек для их визуализации в живых клетках и обнаружения биологически активных веществ. Автором разработана платформа ГКР на основе микрочастиц диоксида кремния с наноструктурированной оболочкой из одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ)/золотые наночастицы. Продемонстрирован эффект нагрева наноструктурированных оболочек из ОУНТ/золотые наночастицы лазерным излучением при двух длинах волн, 532 нм и 785 нм. Проведено экспериментальное определение эффективной

температуры наноструктурированных оболочек на основе измерения стоксового и антистоксового рассеяния главной линии ОУНТ. Отличительной особенностью предложенных наноструктурированных оболочек является наличие наноразмерного нагревателя - золотые наночастицы и наноразмерного термометра - одностенные углеродные нанотрубки.

В диссертации впервые показана возможность визуализация наноструктурированных оболочек микрокапсул из ОУНТ/золотые наночастицы в воде и в как крови методом фотоакустической спектроскопии. Найдено, что интенсивность фотоакустического сигнала микрокапсул выше интенсивности носителей до растворения ядра диоксида кремния, что обусловлено большей эластичностью наноструктурированной оболочки в отсутствии ядра. Интенсивность фотоакустического сигнала от микрокапсул в крови в 2 раза выше, чем интенсивность фотоакустического сигнала, генерируемого кровью. Автором предполагает, что фотоакустическая визуализация микрокапсул будет востребована для целей неинвазивного наблюдения за носителями и их распределения *in vivo*.

Кроме того, в этой главе продемонстрирована возможность одновременной доставки модельного вещества декстран-родамин внутрь живой клетки фибробласта (человека) с помощью микрокапсул, высвобождения декстран-родамина путем воздействия лазера на оболочки микрокапсул и обнаружение декстран-родамина во внутриклеточном пространстве микрочипами нитрида кремния, модифицированных золотыми наночастицами методом ГКР в ближней ИК области с малыми временами накопления сигнала ГКР.

Экспериментальная часть работы А.М. Яценка не лишена и ряда недостатков.

На стр.98 дана ссылка на рис 3.1. но приведенные на рисунке данные не соответствует тексту. Таким образом, утверждение «...уменьшение относительной концентрации наноконтейнеров приводит к снижению количества наночастиц на поверхности микрочастиц карбоната кальция (Образец 1 и Образец 3 на рисунке 3.1)» не подкреплён экспериментальными

данными. Не ясно и то, как именно измеряли степень агрегации. Утверждение автора «Установлено, что для разрушения липосом необходим градиента плотности вокруг липидной мембраны, что обусловлено наличием гидрофобного слоя, где происходит нуклеация с низким порогом кавитации.» не имеет экспериментальных подтверждений, изложенных в тексте диссертации.

Раздел 3.2. логически не связан с разделом 3.1.

Рисунки в каждом разделе приведены в конце текста раздела, а не по ходу его изложения. Это обстоятельство создает заметные трудности при чтении и анализе результатов.

Вместе с тем, отмеченные недостатки не искажают общего положительного впечатления от экспериментальной части работы Яценка А.М. Результаты, полученные автором, содержат вполне определенные признаки научной новизны и имеют неоспоримую практическую значимость.

Раздел Приложения описывает методики и используемое автором оборудование. В целом, этот раздел дает возможность оценить высокий экспериментальный уровень работы Алексея Михайловича Яценка. Но и в этой части встречаются неточности: стр. 266. читаем «хлорид аммиака», а надо бы хлорид аммония; стр. 264. «...к 2 мл суспензии микрочастиц карбоната натрия...» - это водный или спиртовой раствор?; стр. 268. Не указан способ получения, источник и характеристики суспензии эритроцитов; стр. 270. «...Нанесение наночастиц золота на поверхность SWCNT была проведена при добавлении...», стр. 271. «Затем следовала промывка дважды короткая в и трижды по 7 минут каждая в фосфатном буфере».

Приборная часть описана подробно, а вот перечня используемых реагентов и их производителей нет.

Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

Таким образом, диссертация Яценка Алексея Михайловича «Наноструктурированные многофункциональные системы для доставки и детектирования биологически активных веществ» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны и оптимизированы новые подходы к формированию структур типа «ядро-оболочка» и микрокапсул, обладающих чувствительностью к внешнему воздействию, с целью их использования для достижения комплексного эффекта, связанного с инкапсулированием, направленной доставкой и санкционированным высвобождением биологически активных веществ, а также выполнением детектирующей функции с использованием эффекта ГКР. Совокупность полученных результатов можно квалифицировать как научное достижение. Это научное достижение имеет важное социально-экономическое значение в деле развития персонифицированной медицины. Можно утверждать, что полученные результаты соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Яценко Алексей Михайлович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора физико-математических наук по специальности «03.01.02 - Биофизика».

**Официальный оппонент,  
доктор химических наук, профессор,  
директор ФГБУН «Институт биохимической  
физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук»  
119334, Москва, ул. Косыгина д.4,  
+7(499) 137-6420, [director@sky.chph.ras.ru](mailto:director@sky.chph.ras.ru)**

29.12.2016



**И.Н. Курочкин**