

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

СЕВЕРЮХИНОЙ АЛЕКСАНДРЫ НИКОЛАЕВНЫ

«Фотоиндуцированная цитотоксическая активность нетканых материалов на основе хитозана, содержащих фотосенсибилизатор «Фотосенс»,

представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

по специальности 03.01.02 – Биофизика

Диссертационная работа Северюхиной А.Н. посвящена решению одной из **актуальных задач** современной биофизики – разработке новых альтернативных подходов к лечению инфекционных заболеваний, связанной с развитием устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам. Разработка с этой целью новых материалов, обеспечивающих значительный фотодинамический эффект, сопровождающийся цитотоксическим действием фотоиндуцированного синглетного кислорода представляет собой важное направление исследований в области биофизики. Учитывая специфику применения таких материалов, **актуальна** разработка доступных, упрощенных и экономичных вариантов получения на их основе нетканых биоразлагаемых материалов, постепенно высвобождающих фотосенсибилизатор и обеспечивающий его достаточно длительную доставку в область скопления болезнетворных бактерий или раковых клеток синтеза таких композитов. В этой связи, предложенный автором подход к получению новых композиционных материалов на основе хитозана, содержащих в своем составе высокоэффективный фотосенсибилизатор процессов окисления («фитосенс») и полученных с применением современных технологий, в частности электроспиннинга, безусловно, отражает **актуальность и новизну** выполненного исследования, а также представляет научный интерес как в теоретическом, так и практическом отношении.

Диссертационная работа Северюхиной А.Н. состоит из введения, пяти разделов и заключения, а также содержит библиографический список из 175 источников. Работа изложена на 105 страницах, содержит 23 рисунка и 4 таблицы и 22 формулы.

Во **введении** изложена актуальность проведенного исследования, сформулированы цели и задачи диссертационной работы, ее научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** представлен обзор литературы по теме диссертации, где дается подробное описание существующих методов электроформования полимерных волокон и особенностей их применения при получении различных нетканых материалов. Подробно рассмотрены биомедицинские направления применения нетканых полимерных материалов, полученных электроформованием, включая тканевую инженерию и антибактериальную терапию. Особое внимание в обзоре литературы уделено рассмотрению особенностей изготовления нетканых материалов на основе хитозана. Подробно рассмотрен вопрос применения платформ гигантского комбинационного рассеяния света на основе нетканых материалов для мониторинга биохимических процессов.

Проанализированы особенности цитотоксического фотодинамического эффекта, возникающего при локальном поглощении света молекулами фотосенсибилизатора и рассмотрены направления его применения в биомедицине. Рассмотрены методики описания кинетики высвобождения биологически активных веществ из полимерных матриц.

Во **второй главе** представлены использованные при проведении исследования материалы, реагенты, техника проведения экспериментов. Дано описание оборудования и технологической схемы получения нетканого материала в исследованной системе методом электроформования. Дано описание применяемых в работе физических, физико-химических и биологических методов исследования.

В **третьей главе** представлены результаты исследования морфологических и оптических характеристик нетканых материалов, полученных в системе хитозан - полиэтилен оксид – фотосенсибилизатор марки «Фотосенс» при различном содержании фотосенсибилизатора. Рассмотрены экспериментальные данные по кинетике высвобождения фотосенсибилизатора при набухании полимерной матрицы в дистиллированной воде и буферном фосфатно-солевом растворе. Показано, что высвобождение фотосенсибилизатора протекает в два этапа. На первом этапе (около 60 мин) происходит сравнительно быстрое высвобождение фотосенсибилизатора, связанное с быстрым набуханием волокон полимера. На втором этапе кинетика высвобождения красителя подчиняется законам диффузионной кинетики. Обнаружено, что скорость высвобождения фотосенсибилизатора значительно выше в фосфатно-солевом растворе, чем в воде. Рассмотрены результаты исследования морфологических и оптических характеристик полученных нетканых материалов при нанесении на их поверхность плазмонно-резонансными наночастицами золота, позволяющих. Показана возможность использования данной методики для ГКР платформ в составе сенсоров для определения

различного рода биологически активных веществ и маркеров.

В четвертой главе приведены результаты изучения фотоиндуцированной антибактериальной активности нетканых материалов исследованной системы на примере штамма *Staphylococcus aureus* с использованием диско-диффузионного метода. Доказано, что, в отличие от чистого хитозана, исследованный материал проявляет высокие бактерицидные свойства, что связывается с фотодинамическим эффектом от действия высвобождающегося фотосенсибилизатора, в то время как возможности бактерицидного действия чистого хитозана ограничены неспособностью взаимодействовать с мембраной бактериальной клетки и проникать внутрь нее.

В пятой главе представлены результаты исследования цитотоксической активности нетканых материалов на основе системы хитозан - фотосенсибилизатор «фотосенс» методом *in vitro*. В качестве тестовых клеточных культур были использованы раковые клетки Т-47D и нормальные клетки MC3N3 (остеобласты мыши). Показано, что метаболическая активность клеток увеличивается в процессе культивирования совместно с образцами нетканого материала, содержащего фотосенсибилизатор при различных его концентрациях. При этом у раковых клеток для образцов с содержанием «фотосенса» 2,5 и 5% наблюдается значительное снижение метаболической активности по сравнению с контрольными образцами и образцами, содержащими 0 и 1% фотосенсибилизатора. Полученный результат особенно важен в связи с тем, порог «темновой» токсичности фотосенсибилизаторов что до сих пор не определялся. При этом метаболическая активность нормальных клеток не зависит от содержания фотосенсибилизатора, то есть исследованные нетканые материалы могут быть использованы в качестве скаффолдов для выращивания клеточных структур.

При исследовании фототоксичности нетканых материалов анализируемой системы под действием лазерного излучения обнаружено значительное (на 90%) снижение метаболической активности раковых клеток при относительно высокой резистентности нормальных клеток в течение всего периода культивирования. При этом, восстановление метаболической активности раковых клеток не наблюдалось даже через 96 ч после облучения. Рассматриваются различные механизмы подавления действия метаболической активности раковых клеток в результате фотодинамического эффекта. Проведен пространственный контроль над ростом нормальных и раковых клеток, культивированных совместно с нетканым материалом системы хитозан-фотосенсибилизатор под действием излучения светодиода.

Таким образом, новизна диссертационной работы Северюхиной А.Н. заключается в демонстрации возможность получения методом электроформования нетканого материала на основе хитозана, содержащего, на примере добавки типа «Фитосенс», различное (до 5 масс.%) количество фотосенсибилизатора и сочетающего функции поддержки адгезии и профиликации клеточных культур и дистанционно управляемого локализованного цитотоксического эффекта под действием излучения определенной длины волны и интенсивности.

Обнаружено, что кинетика высвобождения фотосенсибилизатора при набухании полученного нетканого материала в буферном фосфатно-солевом растворе (БФСР) и дистиллированной воде протекает в два этапа: быстрое высвобождение в течение первого периода набухания полимерной матрицы (9-10 ч в БФСР и 20 ч в H₂O) и последующего медленного вывода за счет диффузионных процессов.

Посредством диско-диффузионного метода доказана фотоиндуцированная цитотоксическая активность исследованного нетканого материала в отношении штамма бактерий *Staphylococcus aureus*, выявлены количественные соотношения между размером зоны задержки роста бактерий, диаметром области облучения светодиодным источником и диаметром области высвобождения фотосенсибилизатора в агар.

Доказана возможность реализации дистанционного локализованного контроля над ростом нормальных клеток (остеобласты мыши) и раковых клеток молочной железы, инкубированных совместно с образцами предложенного нетканого материала под действием светодиодного источника излучения.

Практическая значимость выполненной работы определяется возможностью применения разработанных нетканых материалов в качестве раневых покрытий с фотоиндуцированной антибактериальной активностью для терапии длительно незаживающих ран, а также скаффолдов, обеспечивающих дистанционный пространственный контроль за ростом клеток.

Полученные в работе результаты оригинальны. Достоверность полученных результатов подкреплена использованием разнообразных современных экспериментальных методов. Работа прошла **хорошую апробацию**. Ее результаты были представлены на престижных международных конференциях. По теме диссертации имеется 9 научных публикаций, в том числе 4 статьи в ведущих рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ. Автореферат и публикации отражают основные положения диссертации.

По диссертационной работе Северюхиной А.Н. можно сделать следующие замечания:

Главный недостаток диссертации является продолжением ее достоинств. Автор излагает результаты своего исследования сжато, конкретно, не отвлекаясь на посторонние детали. Однако, как результат, в работе явно не хватает развернутого обсуждения полученных результатов, анализа потенциала для их использования в дальнейших работах. Это особенно обидно в связи с тем, что полученные данные весьма интересны, работа поставлена оригинально. Однако, при этом, в тексте диссертации опущены некоторые важные детали. Так при выборе моделей для анализа полученных кинетических данных не дается из подробного описания. Наличие ссылки на источник без хотя бы краткого описания особенностей данной методики затрудняет чтение работы, так как требует обращения к первоисточнику (смотри, например, раздел 1.4).

Аналогично, при описании методики проведения экспериментов также опущены некоторые детали, которые затрудняют повторение эксперимента только на основании текста диссертации. В частности, не указан тип растворителя использованного для разбавления уксусной кислоты (с.51), видимо для этого использовали воду, но об этом нигде не сказано. Также нигде не указано как вводился в прядильный раствор фотосенсибилизатор (видимо – также через водный раствор, но не указано какой концентрации). Нет обоснования того, почему при приготовлении маточного раствора растворы хитозана и полиэтиленоксида смешивали в массовом соотношении указанных компонентов 93:7, а не в каком-либо ином соотношении. Не указан класс химической чистоты HAuCl_4 , использованной для экспериментов.

Отмечается, что высвобождение фотосенсибилизатора из нетканых материалов проводилось в фосфатно-солевом буферном растворе, однако нигде не приведен его химический состав. Между тем, из литературы известно, что химический состав таких растворов, используемых в различных исследовательских центрах, часто отличается.

В работе представлено среднее значение диаметра волокон, формирующих нетканый материал, однако отсутствует информация о варьировании этой характеристики в различных частях материала одного химического состава, не указано на основании какого количества измерений проведен этот расчет. Химический состав нетканого материала дан исходя из исходного содержания компонентов в прядильном растворе, при этом, концентрация Фитосенса в полученном продукте – не определялась, также как и степень однородности его распределения в матрице полимера.

На рис.14 представлены кинетические кривые высвобождения фотосенсибилизатора из нетканого материала без указания погрешности измерений.

В работе делается вывод о том, что скорость высвобождения фотосенсибилизатора в фосфатно-солевом буфере значительно выше, чем в воде, что

связывается с изменением свойств скаффолда при изменении значения pH; однако, нигде не указано какое значение pH имела использованная вода. Если pH вод было близко к 7 (нейтральная среда), то отличие от pH буферного раствора (pH=7,4) – не столь велико, чтобы вызвать существенные изменения структуры поверхности скаффолда; если же использовалась свежеприготовленная дистиллированная вода, как правило, имеющая слабо кислую реакцию (pH=5,8-6,0), то это заключение – обосновано. Тем не менее, в работе по поводу pH использованной воды нет никаких комментариев.

Автор при обсуждении полученных результатов делает вывод о присутствии в составе полимерной матрицы «связанного» и «несвязанного» фотосенсибилизатора, однако нет никаких объяснений по поводу механизма связывания фотосенсибилизатора и чем отличаются два этих вида Фотосенса.

Довольно странно выглядит то, что в конце раздела 3.3. дана ссылка на то, что возможность использования метода модификации поверхности нетканого материала частицами золота была продемонстрирована в публикации автора [154]. Затем это же предложение попадает в выводы по главе, но о содержании указанной публикации, то есть что и как в ней было сделано, в самой диссертации упоминается лишь вскользь.

В главе 4 дается оценка антибактериальной активности нетканого материала высвобождающегося фотосенсибилизатора после 2 часов действия облучения, но не дано обоснование выбора времени экспозиции.

Наконец, не ясно, почему автор остановилась на 5% добавке фотосенсибилизатора и не рассматривала возможность использования составов с более высоким содержанием активного компонента: ясно, что эффект будет еще выше, но, в этом случае, почему остановились на добавке 5 масс. %.

В работе встречаются опечатки, даже в названии разделов (смотри например раздел 4.1).

Несмотря на сделанные замечания, вышеуказанные замечания имеют скорее технический характер и не снижают теоретической и практической значимости проведенного исследования и общей положительной оценки работы в целом.

Результаты диссертационного исследования могут быть применены в проведении прикладных научных исследований в ведущих университетах и научных учреждениях РФ, в том числе: Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Институт биофизики клетки РАН, Институт биохимической физики им.Н.М.Эмануэля РАН, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институт биофизики Сибирского отделения РАН, Научно-исследовательский институт физико-химической медицины" Федерального медико-биологического агентства, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени

Н.И.Пирогова, Воронежский государственный университет, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербургский государственный университет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского.

Результаты исследований могут быть использованы для разработки новых видов материалов для медицины и методик их использования в медицинской практике.

Диссертационная работа Северюхиной Александры Николаевны «Фотоиндуцированная цитотоксическая активность нетканых материалов на основе хитозана, содержащих фотосенсибилизатор «Фотосенс», представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу в области медицинской биофизики; которая соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Северюхина А.Н. заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент

Гороховский Александр Владиленович, доктор химических наук, профессор, директор физико-технического института ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.»

410054, Саратов, ул. Политехническая, 77, Физико-технический институт СГТУ имени Гагарина Ю.А.

Тел. +7(8452) 99-87-00

E-mail: algo54@mail.ru

Подпись профессора Гороховского А.В. «Заверяю»:

Ученый секретарь Ученого Совета СГТУ

имени Гагарина Ю.А.,

д.т.н., профессор



10.03.2017

П.Ю. Бочкарев