

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр
Российской академии наук»
(ФИЦ СЦ РАН)
доктор технических наук
Кушников Вадим Алексеевич
« 15 » сентября 2022 г.



Отзыв ведущей организации
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
– обособленного структурного подразделения ФИЦ СЦ РАН (ИБФРМ РАН)
на диссертацию Макаровой Анастасии Олеговны на тему
**«Структура и физико-химические свойства белок-полисахаридных гидрогелей,
армированных углеродными нанотрубками»**
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
1.5.2 – биофизика

Диссертационная работа А.О. Макаровой посвящена изучению влияния многостенных углеродных нанотрубок (УНТ) на структуру, физико-химические и токсикологические свойства белок-полисахаридных гидрогелей, армированных нанотрубками, их способности солюбилизовать биологически активные вещества и обеспечивать активность иммобилизованных и высвобождаемых из гелей ферментов.

Белок-полисахаридные гидрогели характеризуются своеобразной структурой, определяющей целый ряд их специфических физико-химических и биологических свойств, весьма интересных и полезных с точки зрения практики и перспектив применения в биотехнологии и медицине. Среди разнообразных подходов к «зондированию» таких систем с целью оценки их структурных особенностей и возможностей целенаправленных модификаций относительно менее исследованы варианты с использованием наноструктурированных добавок. К таковым, в частности, относятся углеродные нанотрубки, чья история приходится на довольно недолгий, примерно тридцатилетний период, продолжающие привлекать внимание широкого круга исследователей различных специальностей благодаря своей уникальной структуре, механическим, оптическим, электрическим и иным, далеко не до конца исследованным свойствам. Несмотря на изначальную природную биосовместимость углерода как такового, особого внимания заслуживают сведения о возможной токсичности изделий на основе графена, отличающиеся известной противоречивостью и недостаточной широтой охвата большого разнообразия таких систем. В связи с чем можно отметить принципиальную важность токсикологической направленности части исследований, проведенных в рассматриваемой диссертационной работе.

Все перечисленное выше дает основания констатировать несомненную **актуальность** темы диссертации А.О. Макаровой.

Научная **новизна** данной диссертационной работы определяется совокупностью разноплановых характеристик структуры, физико-химических и токсикологических свойств бе-

лок-полисахаридных гидрогелей с включенными УНТ, впервые полученных с использованием представительного набора традиционных и современных эффективных методов исследования. В том числе, турбидиметрии, спектрофотометрии, флуоресцентной спектроскопии, кондуктометрии, реологических измерений, рентгеновской дифрактометрии и малоуглового рентгеновского рассеяния, сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии. Это позволило получить информативные 3D-параметры надмолекулярных структур систем белок-полисахаридных комплексов и выяснить вклад УНТ в их формирование, оценить эффекты инкапсуляции ряда фармакологически и диагностически значимых препаратов и ферментов, охарактеризовать цитотоксичность белок-полисахаридных гидрогелей, армированных УНТ.

Практическая значимость полученных результатов связана с расширяющимися перспективами использования белок-полисахаридных систем и их модификаций в разнообразных биомедицинских и экологических технологиях. Представленные в диссертации сведения о выраженном регуляторном действии УНТ на структуру и свойства исследованных гидрогелей, их относительно слабой цитотоксичности делают целесообразными дальнейшие более углубленные исследования данных систем в конкретных направлениях их возможного применения для создания лечебных материалов в регенеративной медицине, в фармакологии, включая получение лекарственных форм пролонгированного действия, и др.

Обоснованность положений, выводов, сделанных рекомендаций, **достоверность результатов** обеспечены достаточно глубокой проработкой и анализом диссертанткой литературного материала по рассматриваемой в работе проблематике, разнообразием использованных методов исследования, оценками согласованности данных, полученных разными методами, а также их сопоставлением с аналогичными сведениями из научной литературы, статистической обработкой полученных результатов.

Структура и содержание диссертации А.О. Макаровой соответствует основным традициям, характерным для этого вида научной литературы. Работа представлена на 151 страницах текста, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка использованных литературных источников из 235 наименований, содержит 62 рисунка и 6 таблиц.

Во **введении** описана постановка проблемы, дано обоснование актуальности темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследований. Отмечена новизна полученных результатов, их научно-практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту. Приведены сведения об апробации работы на ряде научных конференций и о списке 25 публикаций автора с коллегами по теме диссертации, включающем 6 статей в базах данных Web of Science и Scopus, 1 статью в рецензируемом научном журнале из списка ВАК, 18 тезисов докладов, отраженных в аналитической системе РИНЦ.

Глава 1 посвящена обзору литературы, в котором даны характеристики белкового (желатин) и полисахаридных (κ-каррагинан, альгинат натрия) объектов исследований, комплексообразующих и гидрогелевых систем на их основе, отмечен ряд аспектов биомедицинских применений последних. В части обзора, относящейся к УНТ, рассмотрены их характеристики как возможных модификаторов свойств белок-полисахаридных гидрогелей. Отмечаются проблемы биосовместимости систем с одностенными и многостенными УНТ, обсуждаются физико-химические факторы, обуславливающие их токсичность, степень проявления которой существенно зависит от структуры и параметров УНТ, отличающихся большим разнообразием. В конце главы сформулирована цель исследования.

В **главе 2** описаны материалы и методы исследования, перечисленные выше в характеристике научной новизны работы.

Полученные в диссертационном исследовании **результаты и их обсуждение** представлены в **главе 3** девятью разделами.

Приведены массовые соотношения биополимеров, при которых формируются полиэлектролитные полисахарид-белковые комплексы стехиометричного состава, определенные методом турбидиметрического титрования, использованные в дальнейших экспериментах.

Методом рентгеновской дифрактометрии проведен анализ структуры систем к-каррагинан-желатиновых комплексов в составе исходных зольей, композитного гидрогеля и его модификаций с использованием УНТ. Установлен гомогенизирующий (аморфизирующий) эффект комплексообразования при переходе золь-гель, усиливаемый присутствием в системе УНТ.

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния получены характеристики надмолекулярных структур гидрогелей и оценена их зависимость от наличия в системе УНТ. Отсутствие существенных изменений кривых рассеяния при гелеобразовании интерпретировано автором как свидетельство сохранения общего типа надмолекулярной структуры, а увеличение интенсивности рассеяния при добавлении УНТ – как проявление вклада УНТ с увеличением размера рассеивающих центров. Важной составляющей этих исследований следует признать результаты измерений радиуса инерции, характерного максимального размера надмолекулярных частиц, эффективного размера сшивок, среднего размера полиэлектролитных комплексов (других характеристик размеров частиц) и фрактальной размерности анализируемых структур. Последняя представляет особый интерес, отражая общий тип (уровень сложности) данных структурных образований: от близкого к линейному до близкого к поверхностному и объемному. Полученные значения фрактальной размерности, близкие к 2, принято считать соответствующими полимерным клубкам в хорошем (в термодинамическом смысле) растворителе. Наиболее существенным в этой части работы представляется вывод о соответствии совокупности полученных экспериментальных данных модели Гаусса-Лоренца с сеткой физических взаимодействий и переплетений в геле, дающей представление о механизме гелеобразования.

Анализ морфологии гидрогелей, модифицированных УНТ, выполненный методом сканирующей электронной микроскопии, продемонстрировал практически равномерное распределение УНТ в объеме геля и отсутствие их агрегации. Методом атомно-силовой микроскопии установлено, что внедрение УНТ в к-каррагинан-желатиновый гель приводит к уменьшению шероховатости его поверхности, что свидетельствует о стабилизации надмолекулярной структуры геля благодаря равномерному распределению УНТ в его объеме, в согласии с отмеченными выше результатами исследований методом малоуглового рентгеновского рассеяния.

В разделе с описанием результатов исследований физико-химических и механических свойств к-каррагинан-желатиновых гидрогелей, модифицированных УНТ, представлен анализ их реологических свойств, показавший увеличение вязкоупругих и прочностных характеристик желатиновых и к-каррагинан-желатиновых гидрогелей вследствие их модификации УНТ. В оценках влияния УНТ на температуру гелеобразования и электропроводность гидрогелей продемонстрирована корреляция между их морфологией и удельной электрической проводимостью.

На примере гидрогеля альгината натрия показано влияние катионов двухвалентных металлов на структуру геля, приводящее к существенным отличиям микроструктуры гелевых капсул (с размерами пор в диапазоне 20-200 мкм) для разных катионов, выявляемым с помощью метода сканирующей электронной микроскопии. Это может иметь практическое значение как инструмент регулирования эффективности связывания и высвобождения биологически активных соединений, иммобилизованных в гидрогеле.

Данный аспект возможного применения белок-полисахаридных гидрогелей исследо-

ван автором с использованием синтетических красителей (катионный бриллиантовый зеленый, анионный метиловый оранжевый, нейтральный ФИТЦ), водорастворимых витаминов (рибофлавин, фолиевая кислота) и ферментов (липаза, биназа). Установлена существенная зависимость эффективности связывания данных веществ гидрогелями от пространственной структуры и химического состава биополимерной матрицы, наличия армирующих УНТ.

Методом флуоресцентной спектроскопии оценено влияние иммобилизации в альгинатном гидрогеле на физико-химические свойства ферментов. С учетом характерных сдвигов максимумов кривых в спектрах флуоресценции триптофана – батохромного в случае липазы и гипсохромного в случае биназы – продемонстрировано заметное изменение полярного микроокружения триптофановых остатков липазы и возможная компактизация молекул биназы при их контактах с полисахаридной матрицей, обусловленных электростатическими взаимодействиями.

В завершающем разделе третьей главы диссертации представлены характеристики биосовместимости разработанных белок-полисахаридных гидрогелей, армированных УНТ, в терминах их цитотоксичности по отношению к клеткам опухолевых линий рака шейки матки человека HeLa и клеткам аденокарциномы легких человека A549. Для сравнения проведены оценки цитотоксичности альгинат-желатиновых и альгинат-желатиновых-УНТ гелевых микросфер, стабилизированных катионами кальция и марганца, показавшие их выраженную цитотоксичность в присутствии данных катионов для клеток HeLa (примерно 15% выживших клеток). Заметное снижение доли жизнеспособных клеток HeLa до примерно 50-60% зарегистрировано также для системы к-каррагинан-желатина-УНТ при концентрации гидрогеля от 0.25 мг/мл и выше. В остальных случаях доля жизнеспособных клеток находилась в пределах 80-100%, что дало основание автору диссертации квалифицировать цитотоксичность таких систем как невысокую.

При изучении и обсуждении диссертационной работы А.О. Макаровой возникли следующие замечания и вопросы.

1) Автору можно было бы несколько расширить мотивацию работы в части, касающейся выбора УНТ в качестве «возмущающего» фактора в исследованиях композитных систем белок-полисахарид для их использования в биомедицинских целях (раздел 1.4), с учетом недавних сведений по этой проблеме. В том числе, данных о выраженной токсичности (канцерогенности) систем с УНТ (Barbarino and Giordano, 2021. DOI: 10.3390/cancers13061318). Аргументами в обоснование целесообразности применения УНТ в качестве модифицирующих добавок в биомедицинской практике на стр. 40, 41, 43, 44 (и других) диссертации даны, в частности, ссылки на работы Zhang *et al.* (2010), Cirillo *et al.* (2014), Liu *et al.* (2014), Dong *et al.*, (2015) и др. Однако результаты исследований, представленные в литературе во время и после опубликования статей по вопросам токсичности УНТ, отраженных в литературном обзоре диссертации, послужили основанием Международному агентству по изучению рака (IARC) классифицировать в 2014 году один из типов УНТ как потенциально канцерогенный для человека. Но при этом было отмечено, что широкий спектр физико-химических свойств данных наноматериалов (далеко не в полной мере исследованных) не дает повода для категорических суждений об их токсичности из-за отсутствия объективных доказательств. Более детальное обсуждение в литературном обзоре этих довольно противоречивых аспектов с учетом публикаций последних лет (2015-2021 гг.) могло бы стать дополнительным свидетельством актуальности темы диссертационной работы и значимости представленных в ней результатов.

2) В описании турбидиметрии (стр. 52 диссертации, стр. 6 автореферата) следовало указать толщину (l) используемой кюветы, с которой можно было бы оценить порядок величины мутности систем ($\tau=2.3A/l$) по результатам измерений оптической плотности A на

рисунке 3.1, стр. 68 диссертации (рис. 1, стр. 8 автореферата). Судя по значениям A на указанных рисунках (мутности τ , допуская $l=1$ см), при турбидиметрическом титровании биополимерный материал переходил из состояния с молекулярной (гидрозольной) в состояние с выраженной коллоидной (надмолекулярной) степенью дисперсности. Мутность дисперсной системы является сложной функцией не только концентрации, но и размера частиц, их относительного показателя преломления, уровня полидисперсности системы и т.д. По каким критериям сделано заключение о полноте этого превращения и отсутствии в исследуемых системах свободных молекул белка и полисахарида в точке максимума на кривой турбидиметрического титрования?

3) На стр. 81 диссертации утверждается, что значения фрактальной размерности d_f , приведенные в таблице 3.1 (стр. 80), соответствуют полимерным клубкам, набухшим в хорошем растворителе. Однако в случае желатина при обеих температурах, соответствующих интервалу перехода золь-гель, значения d_f в таблице 3.1, близкие к 1, свидетельствуют скорее о линейной конформации структурных элементов золя и геля. Что согласуется с известной схемой желатина и его превращений при гелеобразовании с изменением температуры, представленной в литературном обзоре на рисунке 1.1 (стр. 13) и рисунке 1.2 (стр. 14), а также с результатами собственных наблюдений автора с помощью метода сканирующей электронной микроскопии (рис. 3.15, стр. 92).

4) Представленный в диссертации иллюстративный материал отличается хорошим качеством. Однако, в тексте имеются невыправленные орфографические и грамматические опечатки, неточности в оформлении. К примеру, структурная единица текста 3.6 (раздел главы 3) названа на стр. 104 параграфом, в то время как подраздел 2.1.1 назван на стр. 106 разделом. На стр. 107 читатель отсылается к рисункам 3.27В,Г, отсутствующим в диссертации.

5) Не вполне удачным и обоснованным нам представляется термин «неправильная сферическая форма», использованный автором по отношению к к-каррагинан-желатиновым частицам (стр. 107). Тем более, что пример, приведенный на рисунке 3.27Б, характеризует такую частицу как некое (приплюснутое) образование, в проекции на плоскость напоминающее скорее «неправильную» трапецию (с присоединенным сверху треугольником). Более адекватной была бы констатация того, что данные частицы не имели регулярной (правильной) формы.

6) Пункт 1 в списке Положений, выносимых на защиту (стр. 9-10 диссертации, стр. 5 автореферата), должен быть изложен в виде краткой формулировки сути полученных результатов (как это сделано в пунктах 2-4), но не в формате оглавления работы.

7) Результаты, приведенные на рисунке 3.38 (стр. 120 диссертации, стр. 20 автореферата), демонстрируют существенное ослабление токсичности препарата к-каррагинан-желатина-УНТ (с 50-60% до примерно 80% выживших клеток) при добавлении в систему фетальной сыворотки. Чем по мнению автора можно было бы объяснить позитивный эффект этой добавки?

Данные замечания и вопросы имеют уточняющий и технический характер, не затрагивают сути и ценности полученных автором разнообразных и качественных экспериментальных результатов.

Согласно Паспорту научной специальности 1.5.2. «Биофизика», диссертационная работа А.О. Макаровой соответствует биологической отрасли науки, специальности 1.5.2 – биофизика, направлению 3. Физические принципы взаимодействия биологических систем с наноразмерными объектами. Данную диссертацию можно признать научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи оценки влияния углеродных нанотрубок на структуру, физико-химические и биологические свойства белок-полисахаридных гидрогелей.

Учитывая все изложенное выше, можно сделать заключение, что по актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа вполне отвечает требованиям, предъявляемой к кандидатским диссертациям в пунктах 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденных постановлением Правительства РФ от 24.09.2003 г., № 842, с изменениями, утвержденными Постановлением правительства РФ от 21.04.2016 г., № 335, а ее автор Анастасия Олеговна Макарова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. – биофизика.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН (протокол № 71 от 30 августа 2022 г.).

Заведующий лабораторией иммунохимии
ИБФРМ РАН доктор химических наук
(02.00.04 – физическая химия),
профессор

С.Ю. Щеголев

Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов
– обособленное структурное подразделение
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра
«Саратовский научный центр
Российской академии наук» (ИБФРМ РАН).
410049, г. Саратов, просп. Энтузиастов 13.
Тел./факс (8452)97-04-44;
e-mail: shegolev_s@ibppm.ru;
<http://ibppm.ru>

Подпись С.Ю. Щеголева ЗАВЕРЯЮ:
ученый секретарь ФИЦ СЦ РАН
к.б.н.



О.Г. Селиванова

05 сентября 2022 г.