

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Яковлева Руслана Юрьевича на тему «Детонационный наноалмаз как перспективный носитель биологически активных веществ», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.04 – физическая химия, 14.04.02. – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы исследований. В настоящее время во многих странах мира активно проводятся исследования по разработке, изучению и практическому применению наноматериалов в различных областях науки и техники. Использование нанотехнологий в области биологии и медицины открывает новые возможности создания нанобиологических устройств для исследования состояния человека: диагностики, профилактики и лечения его заболеваний. Перспективным представляется разработка новых методов и технологий целевой (точечной) доставки биологически активных (БАВ) и лекарственных веществ (ЛВ) в нужные ткани и органы. Особый интерес для этих целей из созданных новых наноматериалов, в том числе, и углеродных наночастиц различной полиморфной модификации представляет детонационный наноалмаз (ДНА), открытый в СССР ещё в 60-е годы прошлого века и обладающий уникальным набором физико-химических и биологических свойств, а также нетоксичностью и высокой биосовместимостью. Поэтому развитие работ по применению детонационного наноалмаза как носителя БАВ и ЛВ является весьма актуальной и перспективной междисциплинарной областью на стыке химических, физических, биологических, медицинских и фармацевтических наук – чему и посвящена основная часть рецензируемой работы Яковлева Р.Ю. В ней также уделено большое внимание получению и исследованию свойств конъюгатов ДНА-БАВ.

Научная новизна исследований. Диссертационная работа Р.Ю. Яковлева содержит новые решения актуальной научной задачи – создание высокоэффективных систем доставки БАВ и ЛВ на основе ДНА, вносящей большой вклад в развитие современных направлений физической и фармацевтической химии. Полученные результаты, в своем большинстве, имеют мировой приоритет. В работе получены следующие основные результаты:

- методом гамма-активационного анализа определены и охарактеризованы основные элементы-примеси в ДНА разных марок. Разработаны способы стандартизации поверхности частиц ДНА путем высокотемпературного

гидрирования и способы дезагрегации частиц ДНА, получения их гидрозолей и определения в них концентрации ДНА методами спектрофотометрии и флуориметрии;

- оптимизированы методики гидрирования, хлорирования и окисления частиц ДНА;

- синтезированы конъюгаты ДНА с глицином, цистеином, амикацином, янтарной кислотой и рядом ферментов (трипсин, химотрипсин, папаин, пиррофосфатаза);

- впервые синтезирован наноалмаз с тритиевой меткой с активностью 2,6 ГБк/г и разработаны методы дальнейшего повышения удельной активности получаемых образцов;

- предложены способы визуализации частиц наноалмаза *in vitro* и *ex vivo*, что позволило изучить трансмембранную диффузию ДНА, его накопление и выведение из организма;

- разработаны новые лекарственные средства (конъюгаты) на основе ДНА и определены параметры токсичности и фармакологической активности синтезированных конъюгатов ДНА с БАВ;

- обнаружено повышение специфической активности лекарственных веществ, привитых на ДНА.

Практическая значимость исследований. Актуальность, научная новизна и практическая значимость работы Яковлева Р.Ю. несомненны. Результаты диссертации, обоснованные на современном научном уровне, представляют собой законченное научное исследование, имеющее фундаментальное и прикладное значения.

Разработанный автором подход унифицирования торговых марок ДНА может быть использован в промышленности при производстве и оценке качества новых образцов ДНА, способы функционализации поверхности ДНА и прививки на нее различных веществ - для направленного изменения свойств наночастиц, а меченные тритием образцы ДНА, по разработанному диссертантом методу, могут использоваться для диагностики поведения меченных тритием наночастиц в живом организме.

Многие из этих разработок защищены патентами РФ, Европы и США и могут быть использованы для решения фундаментальных проблем химии, нанотехнологии и фармации.

По объему выполненных исследований, актуальности и важности нового направления в создании инновационных нанотехнологических лекарственных средств на основе ДНА полученные в работе результаты

имеют важное социально-экономическое, научное и хозяйственное значение в развитии страны.

Объем и структура диссертации. Результаты диссертационной работа Р.Ю. Яковлева изложены на 287 страницах, из них 227 страниц занимает основной текст с 42 таблицами и 90 рисунками, 40 – приложение. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и 390 цитируемых литературных источников отечественных и зарубежных авторов.

Во введении автором убедительно обоснована актуальность и важность выбранной темы исследований, четко сформулированы цели, задачи и направления диссертационной работы, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены основные положения, выносимые на защиту. Описаны структура и объем работы, сведения об ее апробации и личный вклад соискателя.

В литературном обзоре (первая глава) рассмотрены основные носители, используемые в системах доставки лекарственных веществ, подробно описаны углеродные наночастицы. Большое внимание уделено получению и выделению детонационного наноалмаза, рассмотрены модели строения его частиц и их основные физико-химические характеристики, при этом акцент сделан на составе элементов - примесей и функциональном составе ДНА. Описаны известные способы химического модифицирования поверхности ДНА и применяемые для этого реагенты. Много внимания уделено как адсорбционной иммобилизации БАВ различного химического строения, так и их ковалентной прививке, подробно описан известный в литературе комплекс ДНА-глицин. Отдельно рассмотрены гидрозоли ДНА: дезагрегация частиц, оптические свойства и определение их концентрации. Обсуждено использование различных методов и меток (Re-188, I-125, F-18, Tc-99m) для визуализации ДНА *in vitro* и *in vivo*. Подробно рассмотрены известные данные о процессах накопления и выведения ДНА, характер проявляемой его биологической активности и перспективности применения в биомедицинских приложениях. В заключении подразделов обозначены основные проблемы нерешенные задачи в соответствующих областях.

Таким образом, диссертант на основании критического рассмотрения опубликованных литературных данных делает обоснованный вывод о возможности и перспективности применения ДНА как носителя в системах целевой доставки БАВ и ЛВ, формулируя при этом основные цели и задачи предстоящей диссертационной работы и проблемы, которые необходимо решить в ходе её выполнения.

Детальное описание используемых в работе физико-химических методов анализа с применением самых современных приборов, научных подходов и решений, а также методологии проведения экспериментов с ДНА и конъюгатами ДНА-БАВ, методов обработки полученных результатов приведено во второй главе «Экспериментальная часть» диссертации. Большое внимание уделено описанию физико-химических (ИКС, КРС, РФЭС) методов исследования поверхности ДНА, фазового состава (РФА), строения (ПЭМ, СЭМ), дисперсности (ДСК), примесей (ГАА, ИСП-МС), привитых на ДНА меток и веществ (ЭА, ИСП-МС, ВЭЖХ, ЖСС), поведению гидрозолей (ДРС, УФ-спектрометрия, флуориметрия). Обоснован выбор иммобилизуемых на ДНА БАВ и ЛВ и определены их взаимодействующие функциональные группы. Подробно описаны параметры процесса получения гидрозолей ДНА, ДНА с тритиевой меткой ([³H]-ДНА) и методики функционализации поверхности ДНА и присоединения к ней исследуемых БАВ. Приводятся методики изучения диффузии ДНА через мембраны, его биораспределение с двумя видами меток, специфической активности конъюгатов ДНА-БАВ и их острой токсичности на экспериментальных животных.

В третьей главе «Результаты и обсуждение» приведены основные результаты, полученные в диссертации. Коротко остановимся на основных из них. Показано, что промышленные ДНА разных торговых марок имеют существенные отличия по составу находящихся в них примесей, а также по химическому составу и природе функциональных групп на поверхности. Важно отметить, что разные партии одной марки отечественных образцов ДНА отличаются как по составу, так и по концентрации примесей. К тому же изученные ДНА разных производителей имеют разную биологическую активность. Автором разработан и запатентован кислотно-щелочной метод очистки промышленных ДНА от примесей железа, серы, нитрат-анионов и др. Для унифицирования и стандартизации поверхности ДНА разных производителей предложен метод гидрирования при высокой температуре. Для повышения концентрации функциональных групп на поверхности ДНА в работе были оптимизированы методики химического модифицирования поверхности ДНА (время гидрирования, температура хлорирования, окислительные агенты), что позволило автору впервые синтезировать конъюгаты ДНА с глицином (без атомов фтора), цистеином, амикацином, янтарной кислотой, а также рядом ферментов. Причем полученный автором конъюгат ДНА-глицин имел более высокую чистоту по сравнению с ранее

синтезированным в США. Показано, что прививка диаминов с разной длиной углеродной цепи позволяет варьировать стерическую подвижность БАВ на ДНА.

Для использования ДНА в качестве носителя БАВ разработан эффективный способ перевода порошка ДНА в устойчивую коллоидную форму с размерами частиц менее 100 нм с последующим определением их концентрации с использованием методов спектрофотометрии и флуориметрии впервые для этой цели.

Особо важными представляются пионерские данные о комплексном изучении поведения ДНА *invitro* и *invivo*. Для этого был разработан оригинальный способ визуализации ДНА с использованием тритиевой (с удельной активностью до 2600 ГБк/г) и иодной (триодбензиловый спирт) меток.

Важной характеристикой носителя, используемого для целевой доставки БАВ и ЛВ, является его способность проникновения через биомембраны, данные о биораспределении и степени выведения.

С использованием целлофановой и биомембраны (вывернутая кишка крысы) определена степень проникновения ДНА в зависимости от размера агрегированных частиц ДНА и использования ультраволнового воздействия, которая носит симбатный характер. Эти данные были также подтверждены в опытах *invivo*, что позволило автору сделать важное заключение о способности ДНА проникать в отдельные ткани и органы, временно в них накапливаться и, что особенно важно, почти количественно выводятся из организма.

В заключительной части этой главы приведены данные об исследовании основных физико-химических и биофармацевтических свойств синтезированных на основе ДНА конъюгатов. Среди этих данных особенно интересными представляется: большая устойчивость конъюгатов ДНА-ферменты по сравнению с нативными веществами; динамика проникновения конъюгатов в клетки зависит от природы БАВ, а сами конъюгаты не оказывают цитотоксического действия; повышенная активность конъюгатов с привитыми амикацином и глицином. Это позволило автору сделать важное заключение о том, что конъюгаты ДНА-БАВ оказываются более эффективными в своем воздействии по сравнению с исходными БАВ и расширяют спектр фармакологической применимости. Представляется весьма актуальным и интересным подтвердить установленную закономерность на БАВ другой природы.

Переходя к оценке выполненной диссертационной работы в целом необходимо подчеркнуть ее актуальность, фундаментальную и практическую важность, а также междисциплинарный характер. Полученные экспериментальные данные, сделанные на их основе выводы вполне обоснованы и свидетельствуют о достижении поставленных в работе целей и задач. Проведенная работа имеет большое практическое значение и открывает возможность создания на основе ДНА оригинальных и эффективных лекарственных средств с собственным набором свойств. При этом направленная иммобилизация на ДНА БАВ и ЛВ может обеспечить качественный скачок в увеличении их специфической активности, снижении токсичности и побочных эффектов.

При общем положительной оценке оппонируемой работы имеются следующие вопросы.

- Не совсем ясен механизм точечной доставки синтезированных конъюгатов.
- С чем связано наблюдаемое в работе изменение фармакологической активности иммобилизованного на ДНА глицина по сравнению активностью исходного вещества?
- В списке публикаций включена статья об использовании ДНА для сорбции актинидов, однако приведенные в ней результаты не обсуждаются в диссертации и в автореферате.

Эти замечания, пожелания и вопросы не касаются существа выполненной работы и не снижают ее общую высокую оценку.

Основные, полученные в диссертационной работе результаты, опубликованы в научной печати и обсуждены на ведущих международных и всероссийских конференциях и защищены рядом патентов. Всего опубликовано более 60 научных работ, в том числе, 16 статей, из них 14 статей – в зарубежных и российских рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, а также более 50 тезисов докладов, представленных на ведущих международных (Diamond and Carbon Materials, Advanced Carbon Nanostructures, MRS Spring Meeting и др.) и отечественных конференциях, посвященных различным аспектам использования наноматериалов, в том числе, в фармации и медицине. Р.Ю. Яковлев является автором 22 патентов, из которых 19 патентов РФ, 2- Европейского союза, 1- США, а также получено положительное решение о выдаче еще одного патента США.

Полученные в диссертационной работе Р.Ю. Яковлева результаты могут быть применены при разработке новых радиофармпрепаратов, для

доставки которых в опухолевые клетки могут использоваться ДНА; в учебном и образовательном процессах химических и фармацевтических кафедр. Автором издано одно учебно-методическое пособие для студентов ВУЗов. Результаты работы внедрены на промышленном предприятии СКТБ «Технолог», производящем отечественные ДНА, и в образовательном процессе кафедры фармацевтической технологии РязГМУ им. академика И.П. Павлова.

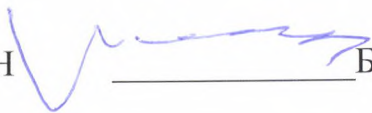
На основании вышеизложенного можно заключить, что Яковлевым Р.Ю. проведена большая, многосторонняя, интересная и важная работа, заслуживающая самой высокой оценки. Содержащиеся в ней выводы обоснованы в достаточной степени полученным экспериментальным материалом с использованием современного оборудования. Диссертации автореферат написаны чётким и ясным языком, легко читаются и содержат много новой важной в научном и практическом отношении информации. Автореферат достаточно полно отражает основные научные результаты, приведенные в диссертации.

Всё вышеизложенное позволяет сделать обоснованное заключение о том, что диссертационная работа Р.Ю. Яковлева полностью соответствует требованиям п. 9 Положения ВАК РФ «О порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 года в редакции от 21.04.2016 года), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – Яковлев Руслан Юрьевич – безусловно заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.04 – физическая химия, 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

При этом следует особо отметить, что диссертационная работа Р.Ю. Яковлева, направленная на решение важной научно-практической задачи – разработку подходов к исследованию, унификации и стандартизации промышленно выпускаемых ДНА и получение на их основе новых, перспективных для медицины нетоксичных конъюгатов ДНА-БАВ, обладающих улучшенной фармакологической активностью, по объему выполненных исследований, актуальности и важности развиваемого нового научного направления, имеет важное социально-экономическое, научное и практическое значение.

В связи с этим и с учетом п. 36 раздела III «Положения о порядке присуждения ученых степеней», как я полагаю, рассматриваемая диссертационная работа Р.Ю. Яковлева «Детонационный наноалмаз как

перспективный носитель биологически активных веществ», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.04 – физическая химия, 14.04.02. – фармацевтическая химия, фармакогнозия, отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук и та же диссертация может быть представлена к соисканию ученой степени доктора химических наук по специальностям 02.00.04 – физическая химия, 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент
академик РАН, советник Президиума РАН,
лауреат Государственной премии СССР
и премий Правительства РФ,
доктор химических наук, профессор,
главный научный сотрудник
Института физической химии
и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН  Б.Ф. Мясоедов

Дата 03.10.2016 г.

Подпись руки Б.Ф. Мясоедова заверяю

 И.Г. Варшавская
Ученый секретарь ИФХЭ РАН, к.х.н.

Борис Федорович Мясоедов,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН»
119071, г. Москва, ул. Ленинский пр-т, д. 31, корп. 4.
Тел.: +7(495)955-46-01, e-mail: tsiv@phyche.ac.ru