

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Гопина Александра Викторовича «Преобразование и концентрирование акустической энергии на искусственно созданных неоднородностях в гидрогелевых средах», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – физическая химия.

Одним из перспективных методов лечения злокачественных опухолей с использованием физического воздействия является сонодинамическая терапия. Ультразвуковое воздействие низкой и средней интенсивности на очаг поражения усиливают специальные нелекарственные препараты – соносенсибилизаторы, которыми могут быть твердофазные включения в виде частицы различной природы. Выбор веществ, способа введения, его количества, режима акустического воздействия для избирательности действия ультразвука на опухоль имеют большое значение. Сонодинамическая клиническая терапия ставит на этапе доклинических исследований задачу прогнозирования и оптимизацию действия соносенсибилизаторов по результатам исследования модельных гелевых систем с нано- и микрофазами как концентраторами акустической энергии. Разрушающее опухоль действие ультразвука связано с преобразованием звуковой волны в теплоту и явлением кавитации, т.е. образованием и схлопыванием газовых пузырьков внутри жидкой среды.

Актуальность и практическая значимость.

Целью работы было выявление факторов, определяющих величины температурных и кавитационных ультразвуковых эффектов в гидрогелевых средах (гидрогели агарозы, полиакриламида, желатины, плуроника), модифицированных твердофазными включениями. Выбранные вещества (сульфат бария, гидроксид железа, гидроксиапатит, терафтал) рассматриваются как соносенсибилизаторы, эффект которых проверяется на модельных гидрогелях, а также (для гидроксиапатита и терафтала) на бактериальных клетках и экспериментальных животных совместно с РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН.

Поставленные автором задачи определения закономерностей, позволяющих сделать правильный выбор соносенсибилизатора, способа его введения и локализации нано- и микроразмерных включений в гелевую матрицу, обеспечивающих наилучшее и селективное УЗ воздействие, несомненно, являются актуальными и практически значимыми. Использование автором трехуровневой системы тестирования УЗ

воздействий (физико-химические исследования → *in vitro* → *in vivo*) дает требуемый результат. В данной работе он получен. Для доклинических испытаний рекомендован гидроксиапатит в виде наночастиц или микрочастиц, синтезированных ферментативным гидролизом растворимых фосфатов.

Научная новизна работы базируется на результатах взаимодополняющих экспериментов по изучению свойств минерализованных гидрогелей, проведенных с использованием комплекса физико-химических методов – электронная микроскопия для определения размера и формы частиц, их локализации, измерение температурных и кавитационных эффектов в гелевых системах, рентгенофазовый анализ и мессбауэровская спектроскопия. Важными для повышения эффективности УЗ обработки гелей с включениями является локализация минеральных частиц на нитях полимеров и гидрофобность их поверхности. Эти условия обеспечиваются при использовании в качестве соносенсибилизаторов не токсичных терафтала и гидроксиапатита.

Важным выводом работы является установление зависимости температурного эффекта УЗ воздействия от концентрации и локализации твердофазного включения.

В этой же части может быть отмечен и проведенный в диссертации анализ фазообразования в гидрогелях на основе диффузионной модели с численными решениями. Этот раздел работы автор не включил в научную новизну, по-видимому, из-за невозможности приблизить её к поведению реального вещества в конкретном геле и тем более в опухолевой ткани. Это дальнейшее развитие теории по данному направлению.

Уровень личного вклада соискателя высокий, что видно по объему экспериментального материала, хорошему оформлению рукописи диссертации и автореферата, списку конференций и статей.

Содержание диссертационной работы изложено в 21 публикации, из них 8 статей из перечня ВАК и баз WoS/Scopus, также имеется 3 патента.

Объем диссертации 153 стр., включая 67 рисунков, 7 таблиц и список литературы из 230 наименований.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, основных результатов и выводов, списка литературы.

Во **Введении** обоснована актуальность темы работы и выбор объектов исследования, сформулированы цели и задачи исследования, отмечена ее научная новизна, практическая значимость работы, даны сведения по апробации работы и личном вкладе соискателя.

Обзор литературы (глава 1) Автором рассматриваются следующие темы в соответствующих разделах: а) образование кристаллических соединений в гидрогелях; б)

процессы, возникающие при воздействии ультразвука на гомогенные и гетерогенные среды, законы распространения и поглощения ультразвука в жидкостях и суспензиях, явление ультразвуковой кавитации и её регистрация; в) методы ультразвуковой терапии онкологических заболеваний, роль соносенсибилизаторов; г) использование гидрогелевых фантомов биологических тканей для отработки режимов работы УЗ-аппаратов; д) обоснование выбора объектов исследования и режимов ультразвукового воздействия.

Соискатель критически анализирует современную литературу по исследуемой проблеме, выделяя информацию, важную для решения поставленных в работе задач.

Экспериментальная часть (глава 2) посвящена использованным в работе методикам синтеза гидрогелей и твердофазных включений и кратко аппаратурным методам, с помощью которых был проведен анализ полученных гидрогелей и модификаторов (рентгенофазовый анализ, сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, мессбауэровская спектроскопия, определение удельной поверхности твердых частиц). Автор привел схемы установок для измерения температурных и кавитационных эффектов, а также методики изучения действия ультразвука и твердофазных соносенсибилизаторов на живые системы (бактерии, мыши) и фотографии облучателей для локальной ультразвуковой терапии опухолей.

Результаты и обсуждения (глава 3) состоит из семи разделов.

Первый раздел посвящен кристаллизации и локализации твердофазных модификаторов в гидрогелях. Автор приводит СЭМ-изображения геля агарозы с сульфатом бария, гелей агарозы (АГ), полиакриламида (ПААМ) и желатины (Ж) с терафталом (кальциевая соль октакарбокситалоцианина кобальта), геля полиакриламида с гидроксидом железа (III), а также рентгеновские дифрактограммы, подтверждающие в случае локализованного в порах сульфата бария присутствие кристаллической фазы модификатора. Гидроксид железа в гелях АГ и ПААМ рентгеноаморфный. Спектры Мессбауэра показали образование ферригидрита дефектной и бездефектной формы.

Во втором разделе определяются температурные эффекты, возникающие при ультразвуковом воздействии гелей с модификатором и без. Результаты представлены в виде графиков динамики роста температуры гелей АГ 3 масс.% и ПААМ 10% с $BaSO_4$ и гидроксидом железа для мощности излучателя 6 Вт, которые аппроксимируются экспоненциальным уравнением. Сравнивая вычисленные стационарные, т.е. максимально достижимые температуры (параметр A уравнения) и их отношения как коэффициент повышения акустической мощности $K=A/A_0$ для указанных систем с концентрациями гелей 1,5% и 3% для АГ и 5% и 10% для ПААМ и 1% и 2% содержанием модификаторов при разной мощности (3,6,9 Вт) диссертант показывает, что наблюдаемые отличия

ультразвуковых температурных эффектов коррелируют с отличиями в типах локализации частиц твердой фазы в гидрогелевой матрице. Сульфат бария был лучшим соносенсибилизатором по температурному эффекту (табл.4, рис.30,31). Зависимости A от концентрации вводимого модификатора (рис.32) были получены для геля АГ 1,5% с сульфатом бария и гидроксиапатитом. Последний находится в виде кристаллитов неправильной формы с размером 100 нм. Описанные выше данные относятся к методу смешения как способу введения модификатора. Для четвертого вещества – кальциевой соли терафталата этот способ сравнивается с методом встречной диффузии, который лучше по значениям K , что показано на примере геля АГ 1,5% с 1% модификатора.

В третьем разделе анализируется вклад модификатора в увеличение интенсивности кавитации в воде и гидрогелях. Показано, что введение нано- и микрочастиц приводит к уменьшению порога возникновения кавитации, к увеличению ее интенсивности. Сильнее это выражено у гидрофобного модификатора (сажа). Модификатор влияет на кавитацию.

Четвертый раздел посвящен ферментативному синтезу твердофазных включений, реализованному для реакции гидролиза глицерофосфата кальция с выделением гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ в присутствии щелочной фосфатазы в водном буферном растворе при рН 9.1 и в гидрогелях АГ и ПААМ. В этих условиях в водной среде образуются очень красивые шарообразные с полостями внутри пористые рентгеноаморфные агрегации (СЭМ-изображения, рис.44) с первичной удельной поверхностью $S_{уд} = 25 \text{ м}^2/\text{г}$. При недельном хранении степень кристалличности и размер частиц возрастает, при этом, пористость и $S_{уд}$ вещества увеличиваются на порядок. Этот неординарный результат автор объясняет рекристаллизацией.

Ферментативный синтез фосфата кальция проведен и гидрогелях АГ и ПААМ. Такой способ минерализации геля привел к значительному росту тепловых эффектов при озвучивании со значениям $K = 2,3$ и $2,9$, что в 2 раза больше по сравнению с терафталом. Данный метод ферментативного синтеза модификаторов является принципиально новым.

Пятый раздел диссертации посвящен результатам изучения влияния ультразвука и твердофазных включений на живых системах – это *in vitro* эксперименты с суспензиями бактерий (терафтал с *E-coli* и *Enterococcus*) и *in vivo* мыши линии BDF-1 с опухолью меланомы (терафтал и высокодисперсный гидроксиапатит). Последний соносенсибилизирующей активностью обладал только в присутствии альбумина. Для бактериальных клеток было показано снижение жизнеспособности после воздействия терафталата и ультразвука, зависящее от концентрации соносенсибилизатора.

Шестой раздел посвящен разработке простой модели фазообразования в гидрогеле, что целесообразно, учитывая эффективность синтеза минерального соносенсибилизатора

внутри геля. Полученные предварительные результаты, определяющие связь между концентрациями и диффузионными параметрами реагентов, а также кинетическими параметрами фазообразования с массой, локализацией и распределением по размерам образующихся кристаллов, дает теоретическую базу для прогнозирования и выбора важных физико-химических параметров. На мой взгляд, вряд ли нужно надеяться на «сокращение числа экспериментальных исследований», но прогноз ряда параметров, например, времени накопления вещества, важен при выборе условий УЗ-воздействия.

Представленная к защите диссертация А.В. Голина выполнена на высоком экспериментальном уровне с использованием взаимно дополняющих современных физико-химических методов исследования и модельных расчетов.

Научные положения, рекомендации и выводы диссертации достоверны, аргументированы и практически значимы.

Диссертация соответствует паспорту специальности 02.00.04 – Физическая химия, оформлена согласно требованиям ВАК Министерства образования и науки РФ.

Автореферат и публикации отражают содержание диссертации.

Результаты работы докладывались на международных и всероссийских конференциях, форумах, сессиях Российского Акустического общества, начиная с 2004 года.

Наиболее значимые результаты относятся к выявлению роли природы вещества-соносенсибилизатора, способа введения, концентрации, влияющих на размер и локализацию минеральных частиц, и обеспечивающих наибольшую величину акустического эффекта по температуре и кавитации в гидрогелях с подтверждением на живых объектах. Но главной проблемой соносенсибилизированной УЗ-терапии является направленное введение в очаг поражения минерального включения, его прекурсора, фермента. Модельные системы (так называемые фантомы) этот вопрос не решают. Об этом диссертант знает и оставляет его на будущие масштабные совместные исследования химиков, физиков, биологов и медиков. В рамках предшествующих практике научных исследований желательно выяснить связь размера и формы минеральных включений с температурным и кавитационным эффектом и соотношение между ними.


Замечания и вопросы, которые возникли при анализе диссертации.

1. При УЗ воздействии происходит редиспергирование частиц в гелях. Рис. 42 (гель агарозы с кальциевой солью терефталата) это подтверждает. Почему данный фактор оставлен без внимания для других включений (гидроксиапатита, BaSO_4)?
2. В методике эксперимента в разделе акустического метода изучения кавитации не приведены первичные данные – сигналы, их спектральный анализ для выделения

- гармоник $f/2$ и $f/3$. В этих исследованиях (рис.37, 38, 39) был агарозный гель с сажей и фталоцианином железа (II). Почему? В других исследованиях этих включений нет.
3. Температурный эффект в акустических полях описывается формулой с параметрами A и B (без ссылки). Смысл A – стационарная температура. Зависимости ΔT от времени озвучивания приводятся, а соответствие этих кривых уравнению нет. Одинаковые ошибки ΔT относятся, по-видимому, к точности показаний термодатчика, а не регрессионной ошибке. О параметре B ничего не написано.
 4. Не обсуждается миграция минеральных включений в гелях, подвергнутых УЗ воздействию, чему способствует уменьшение вязкости геля с ростом температуры. Термостимулированная миграция изменит распределение модификатора в геле.

Заключение. Диссертационная работа Александра Викторовича Гопина по своей актуальности, новизне, объему и значимости полученных результатов соответствует требованиям Пункта 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а её автор достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.04 – Физическая химия.

Профессор кафедры
физической и коллоидной химии
федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Российский университет дружбы
народов» (РУДН), доктор химических наук
(02.00.04 – Физическая химия), профессор
Адрес организации: 117198, Москва ул. Миклухо-
Маклая 6: +7 (495) 434-70-27,
E-mail: rector@rudn.ru, <http://www.rudn.ru>
Адрес оппонента: 117513, ул.ак.Бакулева,8,кв.53
8-926-315-06-17, mikhalenko_ii@pfur.ru


Михаленко Ирина Ивановна

Дата отзыва 24 марта 2017 г.

Подпись И. И. Михаленко заверена

Ученый секретарь Ученого совета



 проф. В.М.Савчин