

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Чумакова Даниила Сергеевича «Оценка цитотоксичности золотых наночастиц с использованием оптических методов и их применение для фототерапии опухолей», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 биофизика.

Диссертационная работа Чумакова Даниила Сергеевича направлена на получение трех типов наноструктурированных материалов коллоидного золота, анализ их физико-химических свойств и токсичности для клеточных линий человека, обезьяны и микроводоросли и применение для деградации опухолей на поверхности организма. **Актуальность** исследований обусловлена распространённостью онкологических заболеваний, являющихся второй по частотам причиной смертности населения в мире, отсутствием универсальных комбинированных алгоритмов лечения разнообразных злокачественных новообразований вследствие отличающихся молекулярных механизмов и развитием бионанотехнологий. Среди многочисленных биофизических и биохимических исследований коллоидных растворов золота работа Д.С. Чумакова отличается оригинальностью и **новизной** 1) метода получения фосфониевых наночастиц золота различного размера посредством восстановления золотохлористоводородной кислоты тетракисгидроксиметилфосфоний хлоридом в разных условиях, и 2) анализа цитотоксичности наночастиц золота не только для традиционных линий клеток человека и млекопитающих, но и для культуры микроводорослей, что необходимо для исследования влияния новых наноматериалов на окружающую среду. **Практическая значимость** определяется супрессией крупных привитых опухолей у крыс в результате введения непосредственно в опухоль золотых наностержней, покрытых оболочками из диоксида кремния и функционализированных гематопорфирином, с помощью фототермической/фотодинамической терапии.

**Структура диссертации** со всеми необходимыми разделами соответствует общепринятой. Необходимо отметить высокое качество 27 рисунков и схем. Вызывает удивление отсутствие таблиц при сравнении методов получения, физико-химических свойств и цитотоксичности наночастиц золота, известных из ранее опубликованных статей и полученных в данной работе.

Обзор литературы посвящён токсичности наночастиц золота различного диаметра и их применению для терапии опухолей. Список цитированной литературы состоит из 232 ссылок и служит свидетельством углубленного хронологического анализа информации за последние 25 лет. Однако в этом списке всего 4 ссылки 2019 года и ни одной статьи, опубликованной в 2020 г., несмотря на рост числа публикаций по теме диссертации. Отсутствие ссылок на отечественные и зарубежные патенты в области нанотехнологий, за исключением одного патента 1999 г. (ссылка №10), также вызывает недоумение. Возможно, фокусирование внимания на цели и задачах исследования не позволили автору показать возможности применения наночастиц золота в

диагностике, визуализации внутриклеточных событий при биомедицинских исследованиях и трансфекции эукариотических клеток экзогенными ДНК, иммобилизованными на поверхности наночастиц Au *in vitro* и *in vivo*.

Раздел «Материалы и методы» включает подробный перечень реагентов, оборудования и детальное описание методов фабрикации наноструктурированных материалов, микроскопии, клеточной биологии. Разнообразие современных методов исследований от просвечивающей электронной микроскопии, атомно-абсорбционной спектроскопии до определения активности антиокислительных ферментатов и фототермической/фотодинамической терапии привитых опухолей у крыс свидетельствует о высоком профессиональном уровне автора. К сожалению, в разделе 2.7 не указаны источники культур клеток человека Hela и обезьяны Vero, в результате множественных пассажей которых в изолированных лабораториях в течение длительного времени возникли варианты. Без необходимой регулярной проверки культуральных сред, сывороток, клеточных линий на наличие микоплазм не исключена их контаминация, что приводит к искажениям результатов определения цитотоксичности.

Раздел «Результаты» описывает экспериментальные данные. Спектры поглощения приведены как в традиционных оптических единицах (Рис. 4), так и в «относительных единицах» (Рис. 5, 6), значения которых не раскрываются. Известно, что нанокластеры металлов, в том числе и золота, состоящие из нескольких атомов и до сотен атомов, размером не более 2 нм подобны молекулам и способны к флуоресценции. Дополнительный анализ интенсивности флуоресценции полученных в данной работе ультрамалых наночастиц золота со средним диаметром  $2.5\pm0.4$  нм, часть которых соответствует диапазону размеров нанокластеров золота, представляет несомненный интерес. Результаты просвечивающей электронной микроскопии, представленные на рис. 5 (а,б) свидетельствуют о наличии агрегатов наночастиц, что не соответствует спектрам (рис. 5в) без сдвига максимума поглощения в более длинноволновую область и, возможно, являются артефактом пробоподготовки при высушивании коллоидных растворов на сеточках для электронной микроскопии. Как описано в большинстве цитированных работ в обзоре литературы, оценку цитотоксичности проводят спектрофотометрическими методами МТТ или ХТТ, а также посредством флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных красителей в составе набора «LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit» (ThermoFisher Scientific). Автор применял альтернативные подходы анализа токсичности наночастиц золота *in vitro*. При этом утверждение на стр. 56 раздела 2.9 главы «Объекты и методы исследования» - «Интегральная интенсивность флуоресценции резоруфина на длине волны 600 нм прямо пропорциональна количеству клеток и их дыхательной активности» не сопровождается ссылками и не подтверждается результатами собственных исследований. К сожалению, в работе не представлены результаты токсичности золотых наностержней *in vitro* и *in vivo*, которые необходимы для понимания экспериментов с лабораторными животными. Для сравнения полученных результатов с литературными данными

требуется указать концентрации, токсичные для 50% клеток (cytotoxic concentrations (CC<sub>50</sub>)), в динамике до тех пор, пока в течение двух последовательных дней не будет изменений цитопатического действия исследуемых наноматериалов. Анализ «эффективности токсического действия» (TE) не позволяет провести всесторонний анализ данных и обсуждение результатов.

Особенности оформления диссертации включают сочетание русских и англоязычных терминов (цетилtrimетиламмониум бромид (ЦТАБ) вместо русского термина «бромид аммония», токсиканты, поллютанты, «интратуморальное» введение вместо «внутриопухолевое», наряду с «чрепкожным» и др.), которые нарушают единство стиля. Несмотря на описание статистического анализа в разделе «Методы», на рисунках не указана достоверность (p) наблюдаемых отличий. Обоснованность и достоверность полученных результатов определяются представленными результатами различных физико-химических методов анализа наноструктур.

Содержание автореферата соответствует результатам диссертации за исключением стилистических отличий, которые не являются принципиальными.

## Заключение

По совокупности полученных результатов, объёму и оформлению диссертации, уровню публикаций в отечественных и зарубежных журналах представленная к защите диссертационная работа соответствует требованиям ВАК п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Даниил Сергеевич Чумаков заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 «Биофизика».

Ведущий научный сотрудник лаборатории  
медицинских нанотехнологий ФГБУ  
Федерального научно-клинического центра  
физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства  
Российской Федерации (ФНКЦ ФХМ ФМБА РФ),  
д.б.н.

Меркурий  
17.11.2019  
119435 г. Москва, ул. Малая Пироговская, д.1а  
Телефон: 8(499) 246-48-43, e-mail: omotorozova2010@gmail.com

Подпись Меркурий  
"зарегистрирован  
заглавий от лица Кефир"



Морозова О.В.

