

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук Ермаковой Светланы Павловны на диссертацию Супрунчук **Виктории Евгеньевны «Нанобиокомпозит на основе фукоидана как система таргетной доставки тромболитического агента»**, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности **03.06.01- Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Актуальность темы диссертации.** Нанобиокомпозиты находят применение в производстве материалов медицинского и фармацевтического назначения. Биодegradируемые нанокомпозиты представляют новый класс функциональных материалов с управляемыми параметрами. Использование в качестве матрицы нанобиокомпозита такого полисахарида, как фукоидан, даст возможность получить уникальный биоактивный, биосовместимый, биоразлагаемый материал. Фукоидан представляет собой высокосульфатированный полисахарид, который обладает широким спектром биологической активности. Для этих целей используется низкомолекулярный полисахарид. Однако в нативной форме фукоидан, как правило, имеет высокий молекулярный вес, что ограничивает его применение и снижает эффективность действия. Поэтому актуальным является поиск способа получения низкомолекулярного фукоидана.

В свою очередь наночастицы магнетита, являются перспективным компонентом при разработке системы доставки благодаря биосовместимости, низкой стоимости, простоте синтеза. Однако, они мало применимы как носители лекарственных веществ, так как в связи с малыми размерами, а также в результате опсонизации могут легко поглощаться ретикулоэндотелиальной системой при попадании в кровяное русло. При функционализации фукоидана такими частицами возможно продлить время циркуляции в кровотоке наночастиц магнетита за счет ингибирования этого процесса. Нанокомпозиты, формируемые на основе фукоидана, функционализированного магнетитом, не рассматривались и не были изучены ранее. В свете изложенного, следовало бы отметить также актуальность получения и исследования наночастиц фукоидана.

Диссертационная работа В.Е. Супрунчук, посвященная разработке метода получения и исследованию наночастиц фукоидана, является важной и актуальной как с фундаментальной, так и с практической стороны.

**Новизна научных исследований, результатов, выводов, рекомендаций** заключается в:

определении условий воздействия ультразвуковой обработки на ультраструктуру, степень сульфатирования полисахарида, выделенного из бурой водоросли *Fucus vesiculosus*;  
получении наночастиц фукоидана (со средним диаметром  $38 \pm 5$  нм) в результате высокоинтенсивной низкочастотной ультразвуковой обработки нативного полисахарида из *Fucus vesiculosus*;  
разработке схемы получения нанобиокомпозита с иммобилизованным тромболитическим ферментом.

Таким образом, получены тромболитические препараты с пролонгированным действием для направленного восстановления кровотока в сосуде.

**Научно-практическая значимость** полученных результатов состоит в:

- оптимизации условий деполимеризации фукоидана с использованием метода ультразвуковой обработки;
- разработке метода формирования фукоидансодержащего композита, исследовании зависимости физико-химических свойств композита от состава материала;
- иммобилизации тромболитического агента на полученные носители, изучении каталитических возможностей иммобилизованного тканевого активатора плазминогена.

Полученные результаты работы могут быть рекомендованы для дальнейшей разработки лекарственной формы препарата.

**Положения, выносимые на защиту:**

- 1) Разработана эффективная воспроизводимая методика контролируемой деполимеризации фукоидана с образованием наноразмерных частиц в водной среде.
- 2) Анализ биологических и физико-химических исследований продемонстрировал зависимость изменения размера, биологической активности и степени сульфатированности от условий ультразвуковой дегградации и состава среды.
- 3) Разработан метод получения эффективной магнитоуправляемой таргетной системы доставки ферментативного препарата на основе полученных наночастиц фукоидана, функционализированных магнетитом.
- 4) Предложен метод синтеза нанобиокомпозитов с иммобилизованным тромболитическим агентом на основе природного полимера, имеющих высокую степень загрузки и намагничиваемости, низкую степень полидисперсности.
- 5) Доказано сохранение каталитической активности иммобилизованного тромболитического агента и низкая цитотоксичность полученных препаратов.



Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса взаимодополняющих физико-химических методов исследования с применением современного оборудования. Интерпретация результатов исследования основана на современных представлениях о физико-химических свойствах микро- и наночастиц.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций, заключений** подтверждается большим количеством экспериментов с подробным описанием методов исследования (ультразвуковая обработка растворов, функционализация магнетитом, иммобилизация тромболитического агента, определение физико-химических и каталитических параметров полученных нанокмозитов), используемых в работе.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа Супрунчук В.Е. изложена на 147 страницах печатного текста и включает 33 рисунка, 7 таблиц, 3 формулы. Научно-квалификационная работа, отражающая результаты научных исследований автора и представленная на соискание ученой степени в виде рукописи и автореферат, оформлены в соответствии с ГОСТ 3 7.0.11-2011. Диссертация включает: титульный лист; оглавление (стр. 2-3), текст диссертации: введение (стр. 4-10), основную часть, состоящую из обзора литературы (стр. 11-42), экспериментальной части и полученных результатов (стр. 43-106), заключения (стр. 106), списка сокращений и условных обозначений (стр. 112) и списка литературы (стр. 114-147). Список литературы включает 305 наименований отечественных и зарубежных источников, из которых более 50 % опубликованы за последние 5 лет. Содержание литературного обзора отражает содержание экспериментальной части. Литературные данные проанализированы и увязаны с задачами проведения эксперимента.

Работа оформлена аккуратно. Рисунки и таблицы отражают полученные экспериментальные данные.

**В качестве замечаний следует отметить, что:**

В обосновании **научной новизны** (стр. 7 диссертации) есть несколько не совсем удачных формулировок, например:

«Проведено систематическое исследование такого воздействия на ультраструктуру, степень сульфатированности, а также биологическую активность полисахарида». Воздействие не может влиять на биологическую активность. В ходе проведенного воздействия произошли изменения в структуре полисахарида и как следствие – изменилась биологическая активность.

«Разработанная схема получения нанобиокомпозита ..... позволяет пролонгировать действие терапевтической дозы препарата...». По разработанной схеме получен нанокompозит, в котором действие препарата в терапевтической дозе является пролонгированным.

«Данный способ получения нанобиокомпозитов .... позволяет повысить восприимчивость фибриновых сгустков к лизису ....». При разработанном способе получены нанобиокомпозиты, в которых повышена восприимчивость фибриновых сгустков к лизису...

«Такие системы доставки с активным таргетингом и низким токсическим действием позволяют получать тромболитические препараты с пролонгированным действием для направленного восстановления кровотока в сосуде. (Системы доставки не могут получать тромболитические препараты).

**В положении 2** (стр. 8 диссертации).

«Анализ биологических и физико-химических исследований продемонстрировал зависимость изменения размера, биологической активности и степени сульфатированности от условий ультразвуковой деградации и состава среды». Автор продемонстрировал зависимость изменения размера, биологической активности и степени сульфатирования фукоидана от условий ультразвуковой деградации и состава среды.

Автор использует термин «сульфатированность» для фукоидана. Правильно использовать «сульфатирование» (сульфатирование – это реакция присоединения серной кислоты по двойной связи): сульфатированные полисахариды, степень сульфатирования (см также русскоязычные версии статей профессоров Звягинцева Т.Н. и Усов В.И. – основателей двух школ в России по изучению полисахаридов из морских и наземных источников).

Одним из объектов исследования является полисахарид из бурой водоросли *Fucus vesiculosus*. Поэтому **в литературном обзоре** автор приводит информацию о структурных особенностях фукоиданов: «Фукоидан(ы) – это термин, используемый для обозначения группы высокосульфатированных полисахаридов». (Стр. 11). Однако фукоиданы бывают и низкосульфатированными (J Dürig, T Bruhn, K H Zurborn, K Gutensohn, H D Bruhn, L Béress. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation *in vitro* // Thromb Res. 1997 Mar 15;85(6):479-91. doi: 10.1016/s0049-3848(97)00037-6). В данном случае правильно использовать «сульфатированных полисахаридов».

У автора существует некоторая путаница с понятиями фукан и фукоидан и он дает уточнение, что «под понятием «фукоидан» в данной работе понимается высокосульфатированный фукан, выделенный из бурых водорослей и имеющий гетерополимерное строение.». Однако фуканы построены из остатков альфа-L-фукозы, то



есть являются гомополисахаридами. Правильнее было бы использовать понятие фукоидан везде.

Автор рассматривает структурное многообразие фукоиданов, информация подтверждена ссылками на соответствующие публикации. Ссылка 23 о фукоидане из *Chordaria flagelliformis*, который содержит как  $\alpha$ -L-фукопираноз, так и  $\alpha$ -L-фукофуранозу не совсем корректна. Это ссылка о синтезе олигосахаридов, структура которых подобна структурным фрагментам фукоидана, выделенного из *Chordaria flagelliformis* в 2008 году (Билан). Правильная ссылка: Bilan MI, Vinogradova EV, Tsvetkova EA, Grachev AA, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*. // Carbohydr Res. 2008 13;343(15):2605-12. doi: 10.1016/j.carres.2008.06.001.

Следует также уточнить ссылки 42 и 43. Согласно описанию в диссертации (стр. 11 и 14) в статьях описана структура коммерческого фукоидана из *Fucus vesiculosus*. Однако по номерам 42 и 43 приведены ссылки о структуре полисахарида из зеленых водорослей *Caulerpa racemosa* и *Monostroma nitidum* соответственно. Несколько непривычно наличие выводов после литературного обзора. В литературном обзоре их следовало назвать заключением.

При ознакомлении с **экспериментальной частью** диссертацией возникли некоторые вопросы:

Стр. 43. «Экстракт осаждали 5% спиртом». Почему такой низкий процент этилового спирта? Обычно для полноты осаждения используют соотношение 1:3 (раствор:спирт 98%).

Стр. 44. Почему использовали ультразвуковое воздействие в течение 40 мин (20 кГц, 133 Вт/см<sup>2</sup>).

В экспериментальной части (стр. 46 диссертации) нет описания обозначений в формуле Хиггенса.

Для обозначения единиц измерения микрограммы в русскоязычной версии обычно используют мкг вместо  $\mu\text{g}$  (это англоязычная версия  $\mu\text{g}$ ).

Следовало привести описание методов математической статистики, которые автор использовал при обработке результатов по определению цитотоксичности.

При ознакомлении с представленными **результатами** возникли следующие вопросы

При подборе мощности ультразвукового воздействия автор делает заключение (стр. 58 диссертации), что с увеличением мощности наблюдалось уменьшение размера частиц фукоидана, что является логичным. Отсутствует объяснение (стр. 55 диссертации) почему с

увеличением мощности ультразвуковой обработки снижался выход полисахарида (без осуществления фильтрации).

Рис. 15 а. График построен с плавными перегибами (0-5 мин), однако точки, по которым эти кривые построены, отсутствуют.

Выводы по проделанной работе, представленные в автореферате (стр. 13-14), несколько сокращены по сравнению с выводами по работе, представленными в диссертации (стр 107-108). Также следует отметить, что диссертация содержит значительный объем данных, которые автору необходимо подготовить к публикации.

В списке литературы ссылку 76 следовало бы привести на русском языке, это не переводная версия статьи. В некоторых ссылках указано название издательства – Elsevier, как правило, эта информация не приводится.

Опечатка в ссылке 204: год публикации не 2010, а 2009 г.

#### **Общая характеристика диссертационной работы.**

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают научной ценности и практической значимости работы, выполненной диссертантом Супрунчук В.Е. Автореферат и научные публикации в виде – 8 печатных работ и 1 патента отражают содержание диссертации. Следует отметить, что полученные результаты были апробированы на 2-х международных, 1 всероссийской и 4 региональных конференциях:

XIX международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» по направлению «Химия живых систем, нанобиоматериалы и нанобиотехнологии» (г. Москва, 2013); региональная научно-практическая конференция «Инновационные идеи молодежи Ставропольского края - развитию экономики России», проводимой в рамках программы «УМНИК» Федерального Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (победитель в номинации Умник РФ) (Ставрополь, 2015); Региональная научно-практическая конференция «Биотехнологии будущего в медицине, фармации и пищевой промышленности» (г. Ставрополь, 2016); XV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа (Москва, 14-17 ноября 2017 г.); Региональная научно-практическая конференция «Университетская наука - региону» (г. Ставрополь, 2011, 2017); Международная научно-практическая конференция «Фармацевтическая технология: вчера, сегодня, завтра» (Пятигорск, 2019). Некоторые аспекты работы разрабатывались в рамках школ и стажировок в ведущих научных организациях: Центр «Биоинженерия» РАН (г. Москва, 2012), Казанский национальный исследовательский технологический университет (г. Казань, 2015), Санкт-



исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (г. Санкт-Петербург, 2018).


Работа представляет собой завершённое научное исследование, включающее обоснование актуальности поставленных целей и задач по получению нанокompозита на основе фукоидана.

В целом, диссертационная работа Супрунчук В.Е. соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), в частности соответствует паспорту специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Работа представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой изложено новое оригинальное решение получения магнито-управляемых нанокompозитов с иммобилизованным тромболитическим агентом, которые могут быть рекомендованы к применению для лечения острых тромбозов.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Супрунчук В.Е. по актуальности темы, объёму выполненной работы, новизне полученных данных и выводов, по качеству и количеству публикаций полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции от 01.10.2018 г), а ее автор Супрунчук Виктория Евгеньевна заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ермакова Светлана Павловна

 /Ермакова С.П./

Доктор химических наук, доцент  
Тихоокеанский институт биоорганической химии им Г.Б.  
Елякова Дальневосточного отделения Российской академии  
наук

690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостока, д.

159

Тел. +79147252424, e-mail:swetlana\_e@mail.ru

Подпись Ермаковой С.П. подтверждаю  
Ученый секретарь ТИБОХ ДВО РАН  
К.х.н. Куриленко В.В.  
23 ноября 2020 года

