

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения «Федеральный научно-  
клинический центр физико-химической медицины имени  
академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-  
биологического агентства»

Профессор РАН, член-корр. РАН, д.б.н. М.А. Лагарькова  
« 13 » февраля 2025 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБУ  
ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России  
на диссертационную работу

**Ерофеева Александра Сергеевича**

на тему «**Нанокapилляpные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов**»,  
представленную на соискание ученой степени доктора физико-  
математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика

Диссертация А.С. Ерофеева «Нанокapилляpные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов» выполнена в лаборатории биофизики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС» Министерства образования и науки Российской Федерации. Данная работа направлена на разработку методов локального анализа биофизических процессов на уровне единичных клеток и *in vivo* биологических моделях с использованием нанокapилляpных сенсоров. Целью является выявление физико-химических параметров, которые могут быть применены для объективной диагностики функционального состояния клеток и тканей организма, а также для создания новых подходов к оценке эффективности инновационных препаратов.

**Актуальность темы выполненной работы и ее связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства**

Изучение физико-химических, биохимических и молекулярно-генетических процессов на уровне клеток является основополагающим для

понимания клеточных функций, метаболизма и деления, что создает новые перспективы для разработки методов диагностики и терапии. Диссертационная работа посвящена разработке и экспериментальной оценке новых нанокapиллярных сенсоров для изучения кинетики формирования внутриклеточных активных форм кислорода, градиента кислорода, локального рН и детекции ионов меди и платины в отдельных клетках и биологических тканях. Изучение этих физико-химических параметров является актуальной задачей, необходимой для понимания фундаментальных процессов метаболизма, роста и деления клеток, а также для разработки новых методов и инструментов диагностики и терапии широко распространенных заболеваний. Для выживания клеткам необходимо поддерживать стабильную нейтральную внеклеточную среду и обеспечивать внутреннюю регуляцию окислительно-восстановительных реакций. Отклонения от нормы могут возникать при активации анаэробного гликолиза в условиях опухолевого роста и воспаления. Кислая внеклеточная среда способствует метастазированию опухолей и оказывает влияние на воспалительные реакции. При таких метаболических нарушениях может развиваться окислительный стресс, что ведет к повышению уровня активных форм кислорода. Опухолевые ткани часто имеют выраженную область гипоксии и, в некоторых случаях, некроза. Для внутриклеточного обнаружения отдельных компонентов обычно используются оптические методы, которые часто основаны на экзогенных маркерах, значительно ограничивая их применение. Диссертационная работа А.С. Ерофеева посвящена разработке оригинальных нанокapиллярных сенсоров, которые могут быть использованы в будущем для объективной диагностики функционального состояния клеток и тканей организма, а также для формирования новых подходов к оценке эффективности инновационных препаратов. Предложенные методы могут дать возможность для оценки эффективности противоопухолевой терапии, исследования доставки и накоплений химиотерапевтических средств при нейродегенеративных дисфункциях, в том числе, при болезни Альцгеймера. Таким образом, результаты диссертационной работы могут быть востребованы среди научно-исследовательских лабораторий медико-биологической направленности и фармацевтических компаний.

#### **Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В результате комплексного исследования методов локального анализа биофизических процессов на уровне отдельных клеток и *in vivo* моделей с помощью нанокapиллярных сенсоров получены следующие выводы:

1) Разработана универсальная платформа для определения концентраций молекулярного кислорода, АФК, ионов металлов и уровня рН на основе ионного и фарадеевского тока, обеспечивающая локальные измерения с нанометровым разрешением в реальном времени.

2) Благодаря малым размерам дисковых наноэлектродов достигнуты высокие аналитические характеристики для изучения клеточных параметров, с временем релаксации  $\tau_{RC}$  не превышающим 10 нс и временем достижения предельного диффузионного тока до 1 мс.

3) Создан метод 3D картирования рН с разрешением до 50 нм для живых систем, выявивший неоднородный рН-градиент в меланомах по сравнению со здоровыми клетками.

4) Разработан метод для локального определения АФК и молекулярного кислорода на уровне единичных клеток и тканей, позволивший установить кинетику генерации АФК при действии терапевтических препаратов.

5) Исследованы градиенты кислорода в различных типах клеток, установлены кинетические изменения кислорода в мозге крысы.

6) Разработан метод электрохимической детекции платиносодержащих препаратов с пределом обнаружения 1 мкМ и проведен анализ их распределения в клетках и опухолях.

7) Создан метод для электрохимической детекции медьсодержащих препаратов с пределом обнаружения 0,1 мкМ и изучено их распределение в мозге мыши.

Полученные результаты открывают новые перспективы для дальнейшего развития исследований в этой области и позволяют получать ценные знания о реакциях биологических систем на нано- и субмикронном уровне с высоким временным разрешением. Также показана возможность создания разнообразных сенсоров на основе наноразмерных капиллярных сенсоров с использованием специфических окислительно-восстановительных потенциалов и селективных лигандов.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследований**

Достоверность полученных научных результатов в диссертации обеспечивается использованием взаимодополняющих экспериментальных методов, расчетами и тщательным анализом собранных данных. Результаты исследования были опубликованы в 32 научных статьях, включенных в журналы, рекомендованные ВАК, а также в международные базы цитирования, такие как Web of Science и Scopus. Кроме того, работа была представлена на различных отечественных и международных конференциях, и по тематике диссертации получено 5 патентов. Все научные положения,

вынесенные на защиту, обоснованы эмпирическими данными и представляют собой выводы с научным основанием. Автореферат диссертации полноценно отражает структуру, содержание и основные результаты, представленные в диссертационной работе.

**Значимость для науки и производства, полученных автором диссертации результатов, сопоставление полученных результатов с уровнем современной науки**

Для обнаружения клеточных аналитов применяются физико-химические методы, такие как оптические, флуоресцентные, электролитические, а также ПЭТ, МРТ и МРС. Наиболее часто используются оптические методы, однако они требуют дополнительной пробоподготовки и использования меток, что может снизить область их применения. Кроме того, они, как правило, не позволяют определять концентрационные зависимости и требуют высокой квалификации оператора. Флуоресцентные методы также имеют свои ограничения, включая быстрое выгорание зондов. В этой связи электрохимические методы представляют собой более перспективный подход. Наиболее актуальны сенсоры на основе нанокапилляров, которые минимально влияют на клетки и ткани, позволяя проводить высокоточные малоинвазивные измерения. Новый подход к определению биофизических параметров с использованием нанокапиллярных сенсоров позволяет дифференцировать клеточные структуры в норме и патологии, что может повысить эффективность диагностики и разработки терапевтических средств. В исследовании также были созданы рН-чувствительные нанозонды с высоким разрешением (50 нм) и временем отклика (2 мс). Представленный в работе метод 3D рН-картирования выступает в качестве инструмента для диагностики онкологических патологий, прогнозирования и оценки эффективности терапии, направленной на снижение кислотности рНе. Кроме того, разработаны наноразмерные платиновые дисковые электроды для определения активных форм кислорода в реальном времени. Предложенный метод может быть использован для оценки эффективности противоопухолевой терапии, исследования доставки и накоплений химиотерапевтических средств, а также изучения механизмов действия препаратов, воздействующих на пути, связанные с АФК. Разработанная электрохимическая детекция медьсодержащих препаратов с помощью золотых модифицированных нанoeлектродов позволяет осуществлять сравнительный анализ накопления и распределения медных препаратов и их эффективность накопления в единичных клетках, 3D-сфероидах и опухолях мыши. Полученные результаты открывают новые перспективы для дальнейших исследований в области

биофизических параметров клеток на нано- и субмикронном уровнях с высоким разрешением.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Представленные научные достижения стали основой уникальной установки «Сканирующий ион-проводящий микроскоп с конфокальным модулем» (рег. номер 2512530) и методик, таких как картирование электрохимически активного материала и обнаружение биологических аналитов в живых организмах. Эти методики востребованы в таких учреждениях, как Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова и ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России. Научные результаты работы «Нанокapиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов» способствовали формированию новых подходов к изучению механизмов регуляции дисфункций мозга, включая нейродегенеративные заболевания, и вызвали интерес у организаций, таких как ИМБ РАН им. В.А. Энгельгардта, РНИМУ им. Н.Н. Пирогова, НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского. Практическую значимость подтверждают акты внедрения, использующие результаты диссертации, такие как применение методов в компаниях ООО «МНТ», ООО «ИКАППИК» и ООО «Дермавитал Групп». Научные результаты открывают широкие перспективы для разработки темы и позволяют получать знания о механизмах отклика биологических систем на нано уровне, демонстрируя возможность создания различных сенсоров с использованием специфических окислительно-восстановительных потенциалов и селективных лигандов.

### **Вопросы по диссертационной работе**

1. Как оценивалось возможное повреждение клеток на работе сенсора при исследовании клеточных сфероидов и мозговых тканей животных?
2. Как оценивалось влияние АФК (если таковое было) на работу цитостатического препарата «Цисплатин»?

В целом, высказанные замечания и вопросы не снижают высокой оценки диссертационной работы Ерофеева А.С., на тему «Нанокapиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов», выполненной на современном научном уровне, которая является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой. В ней изложены новые научно-обоснованные

технические и технологические решения, имеющие существенное значение для развития фундаментальных основ биофизики клетки и современных методов диагностики и разработки инновационных лекарств. Вышеперечисленные замечания не подвергают сомнению высокое качество полученных экспериментальных результатов, не затрагивают существа работы, не ставят под сомнение ее выводы, которые характеризуются бесспорной научной новизной и практической значимостью.

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, выводов и охватывает 255 страниц, включая 125 рисунков, 5 таблиц и список использованных источников с 377 наименованиями отечественных и зарубежных авторов, а также одно приложение. Диссертация написана доступным языком. Автореферат и публикации автора, включая 32 статьи в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также 5 патентов, верно отражают содержание диссертационной работы в достаточной степени.

Считаем, что диссертационная работа «Нанокапиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов» по объему проведенных исследований, качеству их проведения, достоверности полученных результатов, научной и практической значимости полностью соответствует установленным квалификационным требованиям раздела 2 Положения о порядке присуждения ученых степеней в НИТУ МИСИС и требованиям паспорта специальности 1.5.2 – «Биофизика», а ее автор Ерофеев Александр Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора физико-математических наук.

Отзыв, диссертация и автореферат Ерофеев А.С. рассмотрены на семинаре отдела биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», протокол № 1 от 13.02.2025.

Отзыв составил заведующий лабораторией медицинских нанотехнологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА им академика Ю.М. Лопухина

к.ф.-м.н. Клинов Д.В.

