

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ЭКСПЕРТНОЙ КОМИССИИ

по защите диссертации Ерофеева Александра Сергеевича на тему: «Нанокapиллярные сенсоры для исследования биофизических параметров единичных клеток под действием внешних факторов», представленной на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.5.2 – «Биофизика», и состоявшейся в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС» (НИТУ МИСИС) 05.03.2025.

Диссертация принята к защите Диссертационным советом НИТУ МИСИС 25.11.2024, протокол №24.

Диссертация выполнена в лаборатории биофизики НИТУ МИСИС.

Научный консультант – Мажуга Александр Георгиевич, доктор химических наук, профессор кафедры физического материаловедения НИТУ МИСИС.

Экспертная комиссия утверждена Диссертационным советом НИТУ МИСИС (протокол № 24 от 25.11.2024) в составе:

1. Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор кафедры физического материаловедения НИТУ МИСИС – председатель комиссии;
2. Калошкин Сергей Дмитриевич, доктор физико-математических наук, директор института новых материалов и нанотехнологий, профессор кафедры физической химии НИТУ МИСИС;
3. Каменский Владислав Антониевич, доктор физико-математических наук, в.н.с. отдела нанооптики и высокочувствительных оптических измерений федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской академии наук»;
4. Киселевский Михаил Валентинович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточного иммунитета федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;
5. Нечипуренко Юрий Дмитриевич, доктор физико-математических наук, в.н.с. лаборатории ДНК-белковых взаимодействий федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук;
6. Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»;
7. Зайцев Кирилл Игоревич, доктор физико-математических наук, в.н.с. центра лазерной физики и фотоники федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук».

В качестве ведущей организации утверждено федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», г. Москва.

Экспертная комиссия отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- Разработана универсальная платформа для определения внутри- и внеклеточных концентраций молекулярного кислорода, содержания активных форм кислорода (АФК), ионов металлов и pH. Данная платформа позволяет проводить локальные измерения с нанометровым пространственным разрешением в режиме реального времени с разрешением до 1 мс.

- Создан метод для 3D-pH-картирования для проведения экспериментов на клетках и *in vivo* мышинных моделях, основанный на явлении выпрямления тока в нанокапилляре с цвиттер-ионной мембраной. Метод позволяет регистрировать величину pH каждые 2 мс и имеет точность измерения до 0,01 pH. Применение метода 3D-pH-картирования для клеток меланомы A375M выявило наличие гетерогенного градиента экстраклеточного pH, отличный от контроля. С помощью разработанного метода был зарегистрирован профиль градиента pH внутри опухолей 4T1 мышей *in vivo*.

- Разработан метод для локального определения содержания АФК и кислорода (O<sub>2</sub>) в режиме реального времени в отдельных клетках, тканях и в животных, с использованием нанокапиллярных электрохимических сенсоров из платинизированного углерода. Определены параметры генерации АФК в отдельных клетках и на различных глубинах ткани опухолей мышей *in vivo* под влиянием терапевтических препаратов и фотодинамической терапии. Выявлены особенности локального распределения O<sub>2</sub> в экстраклеточной среде у клеток растений, нейрональных тканей гиппокампа мыши, а также проведен анализ изменения концентрации кислорода в мозге крысы в норме и при ишемии в режиме реального времени.

- В работе разработан и внедрен метод для количественной локальной электрохимической детекции платино держащих препаратов с использованием дисковых нанозлектродов с чувствительностью 1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления и распределения цисплатина и его современных аналогов в отдельных клетках, 3D-сфероидов и опухолях мышей. В ткани 3D-сфероиды (MCF-7), была продемонстрирована возможность локального определения зон с высокой и низкой (гипоксия) концентрацией O<sub>2</sub>. Установлена прямая корреляция между распределением метронидазолсодержащего производного цисплатина и областью гипоксии, а также выявлено одновременное высвобождение цисплатина и генерация АФК благодаря фотоактивации Pt(IV) (Рибоплатина) внутри опухолевых сфероидов.

- Разработан метод для локальной электрохимической детекции медьсодержащих препаратов с использованием золотых модифицированных нанозлектродов с чувствительностью 0,1 мкМ. Проведен сравнительный анализ накопления, распределения и эффективности генерации АФК инновационных медных препаратов (I, II) в отдельных клетках, 3D-сфероидов и опухолях мышей. Выявлено распределение АФК и ионов меди в различных областях мозга в норме и при модели болезни Альцгеймера. На примере клиохинола (хелатирующий агент) продемонстрирована возможность мониторинга эффективности терапии этой болезни на моделях мышей *in vivo*.

Практическая и теоретическая значимость работы обоснована тем, что:

1) Были разработаны инновационные подходы для исследования биофизических параметров отдельных клеток, что позволило получить знания о функционировании ряда биологических систем на нано- и субмикронном уровнях с высоким временным разрешением;

2) Метод 3D-pH-картирования предложен в качестве элемента технологии диагностики онкологических заболеваний, прогнозирования и оценки эффективности терапии;

3) Доказана возможность изучения процесса формирования АФК под влиянием терапевтических средств и внешних воздействий на уровне отдельных клеток и в ходе малоинвазивных исследований на *in vivo* моделях. Впервые доказано изменение содержания АФК с помощью электрохимических измерений в реальном времени до и во время фотодинамической терапии. Предложенный подход может быть использован для оценки эффективности противоопухолевой терапии, изучения механизмов действия препаратов и анализа доставки и накопления химиотерапевтических средств;

4) Продемонстрирована возможность сравнительного анализа накопления и распределения инновационных медных препаратов и их эффективности для процесса образования АФК в отдельных клетках, 3D-сфероидах и опухолях мышей.

Разработанные методики и подходы востребованы в ряде научно-исследовательских учреждений, включая Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет и Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России, а также в ИМБ РАН, РНИМУ и НМИЦ психиатрии и наркологии. Разработанные наносенсоры и методы исследования изменений содержания метаболитов активно используются в различных доклинических испытаниях, доказав свою универсальность и эффективность. Результаты работы получили практическое применение в таких компаниях, как ООО ИКАППИК и ООО «Дермавитал групп».

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- Экспериментальные результаты подтверждаются соответствием измерений тестовых образцов данным из научных баз и их многократным воспроизведением. Результаты, полученные с использованием новых методов исследования, хорошо коррелируют с данными, полученными альтернативными независимыми методами анализа

- Полученные результаты этой работы были опубликованы в 37 печатных работах в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ (включая 33 - в базах Web of Science/Scopus); 5 – патентов на изобретения.

- Все научные положения, выносимые на защиту, обоснованы эмпирическими данными и являются выводами с научной доказательностью.

Личный вклад соискателя состоит в:

- обосновании актуальности, формулировании целей и направления исследований, формулировке задач, необходимых для достижения целей;

- разработал новые методы, методики и системы для исследования биофизических процессов на уровне отдельных клеток;

- автор принимал непосредственное участие в проведении экспериментов, а также в анализе полученных экспериментальных данных и результатов исследований, подготовке публикаций, патентов и докладов по теме диссертационной работы.

Пункт 2.6 Положения о присуждении ученой степени доктора наук НИТУ МИСИС соискателем ученой степени не нарушен.

Диссертация Ерофеева Александра Сергеевича соответствует критериям п. 2 Положения о порядке присуждения ученых степеней в НИТУ МИСИС, так как в ней на основании выполненных автором исследований разработаны методы локального исследования биофизических процессов на единичных клетках и биологических моделях *in vivo* с помощью нанокапиллярных сенсоров. Разработанные и реализованные на практике сенсоры позволяют осуществлять скрининг терапевтического действия различных фармакологических препаратов в реальном времени, что открывает новые возможности для диагностики и лечения опухолей и нейродегенеративных расстройств. Полученные научно-исследовательские результаты открывают широкие перспективы для дальнейшей разработки темы за счет возможности создания широкого набора сенсоров на базе наноразмерных капиллярных сенсоров и специфических окислительно-восстановительных потенциалов и селективных лигандов, а полученные результаты могут быть квалифицированы как научное достижение.

Экспертная комиссия приняла решение о возможности присуждения Ерофееву Александру Сергеевичу ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.5.2 – «Биофизика».

Результаты голосования: при проведении тайного голосования экспертная комиссия в количестве 7 человек, участвовавших в заседании, из 7 человек, входящих в состав комиссии, проголосовала: за 7 человек, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель Экспертной комиссии

  
Г.В. Максимов

05.03.2025