

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Шэнь Тяньи

«Наноалмаз содержащие покрытия ксеногенных биологических протезов клапанов сердца: получение и анализ с помощью меченных тритием веществ», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.13 Радиохимия

Диссертационная работа Шэнь Тяньи на тему «Наноалмаз содержащие покрытия ксеногенных биологических протезов клапанов сердца: получение и анализ с помощью меченных тритием веществ» представляет собой чрезвычайно актуальное исследование, находящееся на стыке радиохимии, химии функциональных материалов, биологии и медицины. В работе предложены и проанализированы наноалмазные покрытия для коллагеновых матриц бычьего перикарда, которые являются основой для создания протезов сердечных клапанов. Автор показывает, что применение наноалмазов детонационного синтеза значительно улучшает механико-прочностные свойства материала, придавая ему дополнительные антимикробные характеристики. Это особенно важно, учитывая, что операции по замене сердечных клапанов остаются ключевым методом лечения тяжелых заболеваний сердца. Биологические протезы, изготовленные из тканей животных и доноров, обладают рядом преимуществ перед механическими аналогами. Они не требуют пожизненной терапии антикоагулянтами для предотвращения тромбообразования, что значительно снижает риск осложнений.

Актуальность исследования обусловлена необходимостью улучшения характеристик биологических протезов для увеличения их долговечности и эффективности. Использование наноалмазов, вероятно, позволит не только повысить прочность и устойчивость к инфекциям, но и уменьшить вероятность повторных операций, что критически важно для пациентов, нуждающихся в протезировании клапанов сердца.

Результаты работы имеют потенциал для значительного улучшения качества жизни пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и могут стать основой для разработки новых поколений биопротезов с улучшенными характеристиками. Таким образом, диссертационная работа Шэнь Тяньи заслуживает внимания специалистов и высокой оценки.

Научная новизна работы отражается в следующих пунктах:

1. Впервые показана возможность использования меченных тритием наноалмазов для определения их количества в покрытиях прототипов ксеногенных биологических протезов клапанов сердца. Тритий прочно удерживается в составе наночастиц и не удаляется даже при кипячении их в концентрированной азотной кислоте в течение часа.
2. Впервые получены и охарактеризованы адсорбционные комплексы наноалмазов с левофлоксацином и ванкомицином. Проведено сравнение механизма образования комплекса наноалмазов с амикацином и левофлоксацином; определены параметры кинетики адсорбции ванкомицина на наноалмазах.
3. Впервые показано влияние заряда поверхности и количества наноалмазов на механико-прочностные характеристики коллагенового материала с алмазосодержащим покрытием.
4. Впервые определена *in vivo* стабильность каждого компонента покрытия при эксплуатации материала и его кальцинирование.

Основные научные результаты, полученные в работе сформулированы в виде положений, выносимых на защиту:

1. Наноалмазы детонационного синтеза образуют на поверхности биологической ткани прочные покрытия, улучшая механико-прочностные характеристики материала.
2. Алмазосодержащие покрытия биологических тканей устойчивы в организме и не вызывают дополнительное кальцинирование ткани.
3. Отрицательные наноалмазы, промышленно стабилизированные в форме суспензии, способны сами подавлять развитие бактериальных

инфекций. Их действие может быть усилено введением в состав покрытия адсорбционных комплексов наноалмазы-антибиотик.

Для доказательства положений была отработана экспериментальная методика, включающая получение меченных тритием веществ; получение адсорбционных комплексов наноалмазы-антибиотик; нанесение покрытий на коллагеновые матрицы бычьего перикарда; анализ антимикробных свойств покрытий; изучение стабильности покрытий *in vivo* и их изменений при эксплуатации.

Для определения количества антибиотика на поверхности наноалмазов, описания механизма адсорбции и определения устойчивости адсорбционных комплексов использованы меченные тритием вещества, которые были получены автором работы с помощью метода термической активации трития и выделены с помощью хроматографии. Также в работе получены и использованы меченные тритием наноалмазы и хитозан. Наряду с методом радиоактивных индикаторов в работе использованы современные методы такие как ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье для характеристики наноалмазов и их комплексов с лекарственными средствами и ИСП-АЭС для определения металлов в матрице после эксплуатации животными. Для коллагеновых матриц с нанесенными слоями наноалмаза и хитозана определены механико-прочностные характеристики.

Разработана универсальная методика получения наноалмаз содержащих покрытий, которая была использована для нанесения слоя на аорту свиньи. Материал был покрыт наноалмазами с разным функциональным составом поверхности (положительные и отрицательные). Использовались отрицательные наноалмазы как промышленного производства, так и отрицательные наноалмазы, полученные отжигом на воздухе положительных наноалмазов. С помощью тритиевой метки определено количество наноалмазов в покрытиях до и после эксплуатации в организме животного.

Степень обоснованности научных положений работы вполне достаточна, а выводы, сформулированные в работе, представляются верными в контексте выполненных экспериментов. Содержание автореферата соответствует тексту работы.

При всех положительных характеристиках представленной работы её содержание вызывает ряд вопросов и замечаний, а именно:

1. Цель работы сформулирована как «получение и радионуклидная диагностика антимикробных покрытий, улучшающих свойства материалов животного происхождения, которые используют для изготовления протезов клапана сердца». Правомерность употребления термина «радионуклидная диагностика» в данном случае вызывает сомнения.
2. Выбор модельных соединений: в работе использованы антибиотики (амикацин, левофлоксацин, ванкомицин) для формирования комплексов с наноалмазами. На основании каких критериев были выбраны именно эти антибиотики, и рассматривались ли (хотя бы предварительно) другие классы антибактериальных препаратов? Автором указано, что «выбор антибиотиков обусловлен их различной химической структурой, а также широким спектром действия». Но насколько правомерен данный критерий выбора? Например, при стартовой терапии инфекционных эндокардитов выбор часто падает на аминогликозиды, парентеральные цефалоспорины III поколения и гликопептиды. При этом, наиболее часто при стартовой монотерапии используют цефтриаксон, ванкомицин и оксациллин. А при смене – ванкомицин, гентамицин и ампициллин. В случае же комбинированной терапии наиболее часто упоминается гентамицин (и существенно реже – амикацин).
3. Автором показано, что в случае мечения тритием наноалмазов образуется весьма прочная связь, устойчивая даже в среде азотной

кислоты. Однако, не совсем ясно, было ли подтверждено автором, что в случае исследования меченных тритием антибиотиков (их сорбции и высвобождения с поверхности наноалмазов), наблюдаемая в осадках и супернатантах активность трития ассоциирована именно с антибиотиком (для правомерности проводимой количественной оценки).

4. В работе не приведены значения радиохимической чистоты полученных меченых соединений. Достаточным ли критерием является отсутствие изменения активности в процессе многократной отмывки для утверждения о 100% радиохимической чистоте объектов исследования?

5. Наиболее важным представляется вопрос о валидации использованных методик радиометрического анализа. В диссертации не указано, какие **референтные стандарты** использовались для измерения активности трития. Вопрос в **единообразии стандартов**: эталонные растворы НТО не всегда применимы для сравнения с мечеными органическими соединениями. К вопросу о точности и повторяемости анализа, для доказательства надежности методики необходимо оценить:

Линейность – как изменяется сигнал при разных уровнях активности;

Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) – минимально определяемая концентрация;

Внутрилабораторная воспроизводимость – измерялась ли вариабельность результатов на разных образцах?

Критический вопрос: были ли использованы контрольные пробы для оценки погрешности метода?

6. Не совсем ясна методология оценки стабильности полученных комплексов и композитов. Создаётся впечатление, что автором не в полной мере раскрыт потенциал методов *in vitro* для оценки

стабильности и пригодности объектов исследования. Десорбцию меченых антибиотиков оценивали в изотоническом растворе хлорида натрия и в среде БСА в течение 48 часов при температуре 25 °С. Чем продиктован выбор данного временного интервала и температуры (с учётом конечной цели исследования и предполагаемого применения)? Почему был использован сывороточный альбумин, а не полноценная сыворотка крови, содержащая больше транспортных белков и компонентов, способных влиять на стабильность препаратов? Температура тела человека составляет 36,5-37,2 °С. В сердце же она достигает 38,8 °С. С учётом того, что даже в выбранных автором условиях наблюдается существенная десорбция антибиотика с поверхности наноалмазов, следует ожидать её роста в более приближенных к реальности условия. Также непонятно, почему аналогичное исследование не было выполнено для итоговой матрицы.

7. С учётом десорбции антибиотиков с поверхности наноалмазов даже в выбранных автором условиях *in vitro* (которая, очевидно, будет выше в условиях организма и расти со временем) насколько правомерна оценка антимикробных свойств покрытия, если в использованном тесте концентрация антибиотика фиксировалась на определённом значении, что никак не соотносится с динамическим процессом в условиях организма?
8. В дополнение к предыдущему вопросу: В медицинской практике превентивное введение антибиотиков при установке протезов клапанов обычно осуществляется системно, а не в локальные покрытия. Учитывая изменение концентрации антибиотика и неоднозначность оценки антимикробного эффекта выбранных концентраций возможно достижение на поверхности предлагаемых конструкций концентраций, характеризующихся **сублетальным воздействием на бактерии**, что наоборот приводит к появлению

резистентных штаммов (и это при условии системного выделения малых доз антибиотика в процессе высвобождения из матрицы). Рассматривался ли автором этот аспект?

9. В таблице 23 представлены данные по содержанию наноалмазов до и после имплантации в тело животного. Видно существенное падение содержания наноалмазов за выбранный период времени. При этом автор делает вывод, что «полученные данные свидетельствуют о стабильности наночастиц в составе покрытия при эксплуатации свиньей в течение четырех месяцев». Как данный вывод соотносится с представленными в таблице данными? Если же речь идёт об отсутствии какой-либо деградации самих частиц, то этот вывод неоправдан своей очевидностью в данном контексте, так как автором сообщается о стабильности частиц даже в концентрированной азотной кислоте.
10. Конечно же в работе присутствует достаточное количество лексических ошибок, опечаток и неточностей, что, однако, не искажает сути и требует снисхождения в данном случае.

Приведённые замечания, однако, не снижают общего положительного впечатления о работе. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.13 Радиохимия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Диссертация Шэнь Тяньи представляет собой законченную научно-исследовательскую работу по заявленной актуальной теме, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.13 Радиохимия (химические науки).

Официальный оппонент:

Кандидат химических наук
(02.00.14 — радиохимия),
Заведующий отделом радиационных
технологий медицинского назначения,
Заведующий лабораторией технологии
и методов контроля радиофармпрепаратов
ФГБУ ГНЦ ФМБУ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Ларенков Антон Алексеевич

31.01.2025