

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного
учреждения науки Института металлургии и
материаловедения им. А.А. Байкова
Российской академии наук (ИМЕТ РАН)
Проф. РАН, д.т.н., чл.-корр. РАН

№ _____

В.С. Комлев

« 18 » _____ 2022 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертации

Котяковой(Гудзь) Кристины Юрьевны

на тему: «Разработка гибридных наноматериалов на основе
гексагонального нитрида бора с высокой бактерицидной и фунгицидной
активностью», представленной на соискание ученой степени кандидата
технических наук, специальность 2.6.5. – Порошковая металлургия и
композиционные материалы

Актуальность темы

Современные подходы терапии инфекционных заболеваний направлены на совершенствование принципов рационального применения антибиотиков в лечебной практике. Основная сложность при лечении инфекций состоит в высоком, часто бесконтрольном, потреблении антибиотиков широкого спектра действия, вызывающем сопутствующие нарушения/заболевания, и, важно, приводящем к росту уровня приобретенной резистентности. Указанные проблемы в общем касаются не только медицинской практики

(амбулаторной, стационарной, самолечение), но также агроиндустрии, водопереработки и т.д. В стремлении к преодолению обозначенных проблем отмечают необходимость в более рациональном подходе к выбору стартового режима терапии с учетом вероятного спектра возбудителей и их возможной резистентности, снижение дозы и спектра действия препаратов. В настоящее время в биомедицине большие перспективы связывают с применением локальной доставки наночастиц с бактерицидными агентами в пораженную зону. Благодаря малым размерам и специфическим свойствам наногибридные конструкции способны связываться непосредственно с целевой биомолекулой или клеткой и эффективно воздействовать на нее. С этих позиций, диссертационная работа Котьяковой К.Ю., направленная на разработку наноструктурированных материалов с высокой бактерицидной и фунгицидной активностью, способных преодолеть лекарственную устойчивость без каких-либо дополнительных побочных эффектов для организма пациента, решает крайне актуальную научно-техническую задачу и имеет важное значение для областей ортопедической и стоматологической хирургии. Актуальность работы подтверждается многочисленными научными программами последних лет (2018-2022 гг.), в рамках которых проведены исследования по теме диссертации.

Диссертационная работа Котьяковой К.Ю. посвящена созданию наноструктурированных матриц на основе гексагонального нитрида бора (h -BN), модифицированных бактерицидными металлами и антибиотиками, исследованию их структурных особенностей и механизмов подавления инфекции. Наноразмерный h -BN рассматривается как безопасный цитосовместимый носитель лекарственных препаратов, обладающий большим потенциалом для систем доставки в антибактериальной терапии. В качестве антибактериальных агентов использованы частицы серебра и железа, в качестве антибиотиков – гентамицин и амфотерицин В как одни из широко применяемых в антибактериальной и противогрибковой терапии. Задачи

работы охватывают комплекс проблем касательно получения наночастиц и нанопокровов на основе *h*-BN для инкорпорации лекарственных агентов; осаждение на поверхность матриц наночастиц Ag, Fe и иммобилизация терапевтических препаратов. Диссертант преследует идею поиска оптимальных ингибирующих концентраций указанных агентов как в отдельном их применении, так и в комбинации, основываясь на исследовании физико-химических и структурных свойств нанообъектов, динамики высвобождения препаратов из матриц, биологических испытаний антибактериального и противогрибкового эффектов полученных наногибридных конструкций и изучения механизмов подавления патогенов. Все поставленные диссертантом задачи выполнены более, чем в полной мере.

Структура и основное содержание работы

Диссертационная работа изложена на 141 странице, содержит 16 таблиц, 51 рисунок, список литературы из 256 ссылок и 2 приложения. Работа состоит из 5 глав, большинство из которых имеют по несколько разделов и подразделов. Работа написана грамотным научным языком, хорошо иллюстрирована и имеет традиционное построение: введение, обзор литературных данных, описание используемых материалов и экспериментальных методов, результаты и их обсуждение, выводы, список используемых источников, приложения.

Во *введении* обоснована актуальность работы, определены цели и основные задачи, представлены объекты и методы исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость результатов. Приведена информация по апробации работы и описана структура работы.

Первая глава посвящена аналитическому обзору научно-технической литературы, в котором отражены сведения о современных достижениях в области создания материалов для бактерицидной терапии: как материалов-носителей в виде различных покрытий и наночастиц, так и лекарственных

агентов – наночастиц металлов и их оксидов, широкого ряда антибиотиков. Описаны механизмы подавления бактериальных инфекций различными агентами, в том числе обладающих множественной лекарственной устойчивостью. В обзоре подчеркивается, что повысить эффективность бактериальной защиты возможно за счет одновременного действия нескольких механизмов подавления патогенов. Описана перспективность использования в биоинженерии наноструктур на основе *h*-BN. В заключении сформулированы основные задачи исследования, направленные на разработку многофункциональных антибактериальных наноструктур, способных справляться со множественной лекарственной устойчивостью.

Во *второй главе* приводится информация об исходных материалах, используемых в работе, описано оборудование и методы исследования. Приведены используемые технологии синтеза наноструктурированных покрытий и наночастиц на основе *h*-BN, режимы и параметры осаждения на них наночастиц (НЧ) бактерицидных металлов и пришивки антибиотиков к поверхности. Указаны исследовательские методики и оборудование, в том числе для установления физико-химических закономерностей, изучения кинетики выхода бактерицидных агентов, образования активных форм кислорода (АФК), а также контактного взаимодействия материалов с бактериями.

Третья глава посвящена изучению полученных покрытий на основе *h*-BN, выявлению их структурных особенностей, таких как наноразмерность, форма в виде игл или лепестков и высокоразвитая поверхность, необходимые для эффективной адсорбции антибактериальных агентов, а также усиления контактного повреждения оболочек бактерий. Показано, что в результате осаждения растворов металлов на поверхность покрытий серебро находится в металлическом состоянии в виде округлых наночастиц, тогда как железо – в виде стержнеобразных наночастиц или тонкой пленки смешанных оксидных форм. В экспериментах по изучению выхода ионов в модельный раствор

установлен быстрый выход Ag^+ из образцов в течение первых нескольких часов и более медленный в течение следующих нескольких дней. Показано успешное насыщение *h*-BN-покрытий антибиотиками гентамицином и амфотерицином В. Иммобилизация антибиотиков не значительно окисляет поверхность носителя и улучшает смачиваемость поверхности гидрофобного BN в зависимости от вида и дозы препарата, что, в свою очередь, играет важную роль в дальнейших процессах адсорбции клеток и белков на поверхности биоматериала. Выявлена зависимость выхода препаратов от их загруженной концентрации, а также определена динамика высвобождения, которая обуславливается начальным быстрым растворением лекарственного средства и дальнейшим замедленным – за счет поверхностного связывания.

В *четвертой главе* описаны результаты исследований наночастиц на основе *h*-BN, характеризующихся узким распределением по размерам в диапазоне 60-120 нм, сферической формой, полых в объеме, в водных суспензиях достаточно стабильных во времени. Показано, что осаждение НЧ Ag размером от 3 до 15 нм не влияет на размер и морфологию НЧ BN. Показано влияние на стабильность суспензий на основе наночастиц *h*-BN и *h*-BN/Ag вида и концентрации загружаемых препаратов: повышение дзета-потенциала частиц за счет положительно-заряженного гентамицина (и увеличение стабильности суспензий), и его снижение – за счет отрицательно-заряженного амфотерицина В. На основании измерения дзета-потенциала и размера наночастиц *h*-BN и *h*-BN/Ag, а также значений минимальной ингибиторной концентрации антибиотиков, определены оптимальные концентрации загружаемых в наночастицы гентамицина и амфотерицина В. По результатам исследований высвобождения препаратов из наночастиц выявлено, что количество терапевтического агента, выходящего из НЧ BN и BN/Ag в фосфатно-солевой буферный раствор, зависит от дозы загрузки: чем выше доза, тем выше концентрация и более продолжительный выход.

Пятая глава посвящена описанию и анализу результатов биологических испытаний наноструктур, изучения механизмов их взаимодействия с бактериями *E. coli*, а также исследования генерации АФК. Показан выраженный и пролонгированный бактерицидный эффект покрытий *h*-BN в отношении штамма *E. coli* К-261, обусловленный механическим повреждением мембран бактериальных клеток при контакте с острыми наночастицами покрытия, а также за счет способности генерировать АФК, приводящих к окислению липидных компонентов мембран и последующей гибели бактерий. Установлено, что образцы покрытий с иммобилизованными антибиотиками и наночастицами Ag и Fe имеют выраженные бактерицидные и фунгицидные свойства, при этом ингибирующее действие агентов зависит от концентрации и специфично для каждого вида бактерий и грибов. Наночастицы Ag проявляют более сильный бактерицидный эффект при более низких концентрациях в сравнении с наночастицами Fe, которые, в свою очередь, проявляют меньшую токсичность и более безопасны. Продемонстрировано успешное действие комбинированного насыщения антибактериальным препаратом гентамицином и противогрибковым – амфотерицином В на разнообразных бактериальных штаммах и культурах мицелия, в сравнении с отдельно насыщенными. Также выявлено повышение фунгицидной активности образцов, нагруженных наночастицами серебра (как с антибиотиками, так и без них).

В заключении работы подведены итоги работы и сформулированы основные *выводы*.

Практическая значимость

Основным итогом работы являются положения, выносимые диссертантом на защиту:

1. Зависимость размера и дзета потенциала наночастиц *h*-BN/Ag-Гентамицин и *h*-BN/Ag-Амфотерицин В от концентрации терапевтического компонента.

2. Зависимости антибактериальной и фунгицидной активности от типа и концентрации терапевтических агентов, загруженных в наночастицы и покрытия *h*-BN.

3. Зависимости антибактериальной и фунгицидной активности от типа и концентрации бактерицидных наночастиц на поверхности покрытий и наночастиц *h*-BN.

4. Сильный антибактериальный эффект (>99%) покрытия *h*-BN в отношении антибиотик-резистентного штамма кишечной палочки K-261 (сопоставимый с образцом *h*-BN, загруженным гентамицином (150 мкг/см²)), который объясняется одновременным механическим повреждением бактерий и генерацией реактивных форм кислорода.

Практическая значимость результатов работы не вызывает сомнений, поскольку был разработан способ получения наноструктурированных покрытий на основе *h*-BN с антибактериальным эффектом, зарегистрированный в виде ноу-хау в депозитории НИТУ «МИСиС». Определены минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков (гентамицина, амфотерицина В) в наноструктурах *h*-BN для подавления широкого спектра бактериальных и грибковых штаммов. Проведены биологические испытания исходных и поверхностно-модифицированных покрытий и наночастиц на основе *h*-BN, которые продемонстрировали высокие антибактериальные и фунгицидные свойства наноструктур, что позволило их рекомендовать в качестве перспективных материалов для борьбы с бактериальной и грибковой инфекциями.

Научная новизна диссертационной работы

Котьяковой К.Ю. по результатам диссертационной работы получены новые сведения о закономерностях процессов насыщения наноструктурированных покрытий и наночастиц на основе *h*-BN антибактериальными и противогрибковыми препаратами гентамицин и амфотерин В и наночастицами металлов Ag и Fe.

В том числе, впервые продемонстрировано воздействие *h*-BN-покрытия на бактериальные клетки *E. Coli*, заключающееся в механическом повреждении мембраны при непосредственном контакте с наночастицами покрытия.

Определены оптимальные концентрации загружаемого в наночастицы гентамицина и амфотерицина В, обеспечивающие сильный бактерицидный и фунгицидный эффекты.

Установлены закономерности выхода металлических ионов и антибиотиков с поверхности покрытий в зависимости от их концентрации.

Найдены минимальные ингибиторные концентрации наночастиц серебра (25 мкг/см²) и оксида железа (74 мкг/см²) на поверхности покрытий *h*-BN, необходимые для эффективного подавления штаммов бактерий кишечной палочки, золотистого стафилококка, пневмококка и кандидозного парасилоза.

Получены гибридные полые наносферы *h*-BN с широким спектром антибактериального и фунгицидного действия за счет комбинированного воздействия бактерицидных ионов и терапевтических средств.

Степень обоснованности и достоверности научных положений

Научные положения, выводы и рекомендации диссертации обоснованы и достоверны, поскольку они базируются на широком анализе мировых достижений в данной области, значительном объеме эксперимента с достижением крайние значимых научных результатов. Применен профессиональный многопрофильный подход, обеспеченный применением современных технологий создания наноструктурированных материалов, разнообразных принципов их функционализации лекарственными препаратами, а также использованием набора современных аналитических и инструментальных методов, включая инфракрасную спектроскопию, рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию, растровую и просвечивающую электронную микроскопию высокого разрешения, методик

измерения дзета-потенциала, изучения смачиваемости поверхности, высвобождения ионов и лекарств с поверхности функционализированных материалов, измерения количества генерируемых АФК, оценки фунгицидных свойств, нескольких методик оценки бактерицидной активности, и, что отличительно, на весьма значительном количестве штаммов бактерий и культур грибов.

Соответствие работы требованиям, предъявляемым к диссертациям, публикации и апробация, рекомендации по использованию результатов

Тема и постановка исследования диссертации отвечают заявленной специальности, все результаты соответствуют поставленным цели и задачам, четко и грамотно отражены актуальность, новизна и практическая значимость результатов работы. Полученные результаты являются оригинальными и вносят существенный вклад в развитие современных биоматериалов для адресной доставки лекарственных препаратов; могут быть рекомендованы для практического использования на инновационных предприятиях, специализирующихся в области разработки, серийного производства и реализации имплантируемых медицинских изделий из новых материалов для травматологии и ортопедии.

Работа прошла достаточную апробацию на конференциях, результаты представлены в 10 публикациях, из них 3 публикации в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, имеется 1 ноу-хау, что отражает важность проведенных научных изысканий для современной науки и производственных технологий.

Замечания по диссертационной работе

В целом, положительно оценивая диссертационную работу, есть некоторые замечания и пожелания, несущие, в основном, познавательный характер:

1. Касательно технологических этапов. Хотелось бы уточнить оригинальность метода, технологических параметров, применяемого оборудования для получения искомых VN-носителей лекарственных препаратов, являются ли они разработкой лаборатории или вполне распространены.
2. Как выполнялось хранение наночастиц и покрытий: в каком виде и условиях?
3. Хотелось бы уточнить условия осаждения серебра на поверхность наночастиц VN: был ли это водный раствор и последующая сушка, концентрация раствора, температура сушки? Не было ли высвобождения серебра при промывке водой?
4. Стр. 39, при характеристике покрытий VN методом ЭДА выявлено содержание В/N~74/25, методом РФЭС - В/N~40/52, разница обусловлена различием исследовательских методов. Очевидно, достаточно проблематично однозначно указать распределение элементов в наноструктурированном, весьма шероховатом объекте. Однако, интересно понять, как может повлиять сильный разброс содержаний основных элементов (а также в дальнейшем – частичное окисление бора) на последующие процессы и свойства полученных материалов; оказывает ли хим. состав влияние на адсорбционные свойства материала по отношению к используемым лекарственным средствам и влияние на цитосовместимость?
5. Была ли оценена разница между количеством фактически загруженных агентов и выявленным по результатам исследований в VN-материалах, т.е. «технологические потери»?
6. Нет ли взаимодействия G с A, например, в результате хелатирования или связывания др. рода?

7. Рис. 22. Почему на подобной диаграмме (рис. 19 б) есть для фазы V_2O_3 пики при 2θ примерно 16 град и 32 град, а здесь нет, но есть при 58 град?
8. Было бы наглядно в обзорной или методической части диссертации привести схему строения молекул антибиотиков – для большего понимания взаимосвязи с физико-химическими свойствами.
9. Пожелание. Действительно, проведено весомое исследование – от синтеза собственно носителей и нанесения лекарственных агентов – до исследования физико-химических свойств, и затем последовательно выхода лекарств, изучения антибактериальной и противогрибковой активностей; однако очевидным становится желание проследить результаты исследования на биосовместимость, хотя бы самих носителей, т.к. есть подозрения на влияние на нормальные клетки особенностей поверхности наноструктурированных покрытий, подобно тому, как при контакте с бактериальными клетками. Было бы уместно привести имеющиеся в литературе данные по влиянию концентраций выбранных лекарственных препаратов на цитотоксичность.

Указанные замечания не умаляют теоретической и практической значимости диссертационного исследования, а полученные в диссертации результаты соответствуют поставленным цели и задачам.

Заключение

Диссертационная работа Котьяковой(Гудзь) Кристины Юрьевны на тему: «Разработка гибридных наноматериалов на основе гексагонального нитрида бора с высокой бактерицидной и фунгицидной активностью» по экспериментальному, методическому и теоретическому уровням, объему работы, уровню опубликованных работ, актуальности, научной новизне, научной и практической значимости, достоверности полученных результатов и степени обоснованности выводов полностью отвечает требованиям,

предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе «Положения о порядке присуждения ученых степеней в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». Содержание диссертации соответствует паспорту научной специальности 2.6.5. – «Порошковая металлургия и композиционные материалы». Таким образом, соискатель Котякова(Гудзь) Кристина Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата технических наук по специальности 2.6.5. – «Порошковая металлургия и композиционные материалы».

Отзыв составлен и принят на основании анализа диссертации, автореферата и публикаций соискателя, обсуждения доклада Котяковой(Гудзь) К.Ю. на заседании коллоквиума лаборатории Керамических композиционных и биоматериалов (№20) ИМЕТ РАН, протокол № 4 от 29.09.2022г.

Директор ИМЕТ РАН
д.т.н., чл.-корр. РАН


В.С. Комлев

« 18 » 10 2022 г.

Председатель коллоквиума,
и.о. зав. лаб. №20 ИМЕТ РАН,
Старший научный сотрудник, к.т.н.


Петракова Н.В.

« 18 » октябрь 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук (ИМЕТ РАН),
119334, Москва, Ленинский пр., д. 49,
Тел.: +7 (499) 135-2060, e-mail: imet@imet.ac.ru.