

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Филатовой Елены Викторовны на тему «**Лекарственные системы противоопухолевого действия на основе микросфер из поли-3-оксибутирата**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия

Онкологические заболевания – одна из основных медико-социальных проблем всего мира, в том числе и России. Частота выявления злокачественных образований, смертность от онкологии, к сожалению, с каждым годом только увеличиваются. Учитывая основные недостатки традиционной противоопухолевой лекарственной терапии: избирательный характер действия препаратов на клетки и ткани – разрушение вместе с раковыми здоровых клеток и тканей; высокая токсичность и, как следствие, наличие большого числа побочных эффектов и осложнений; многократность введения; быстрое высвобождение препарата, актуальной проблемой в лечении онкопатологии является поиск новых средств доставки цитостатических препаратов, способных адресно доставлять лекарство в место локализации опухоли, пролонгировано и равномерно выделяться в определенном количестве.

Поиск способов направленной доставки токсичных лекарственных веществ к пораженным участкам организма позволит увеличить безопасность препарата, снизив его побочные и токсичные эффекты, сократить частоту приема препарата и существенно повысить эффективность терапевтического лечения. Это направление исследований активно развивается учеными всего мира. Однако до сих пор проблема создания эффективных, безопасных – нетоксичных или малотоксичных лекарственных препаратов не решена. На фармацевтическом рынке присутствуют только импортные формы лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением.

Значительный вклад в решение этой проблемы вносит работа Е.В. Филатовой, посвященная разработке отечественных лекарственных систем с контролируемым высвобождением противоопухолевых препаратов на основе природного полимера – поли-3-оксибутирата. Диссертационное исследование Е.В.Филатовой является **актуальным**, имеет важное научное и практическое значение.

В работе Е.В.Филатовой поставлены следующие задачи:

1. получение природного биоразлагаемого полимера - полиоксибутирата (ПОБ);
2. получение микросфер с добавлением различных цитостатических препаратов;
3. изучение кинетики высвобождения введенных препаратов из микросфер;
4. изучение биодеструкции и биосовместимости полученных микросфер;
5. оценка цитотоксичности и химиотерапевтического воздействия микросфер на культуре ткани опухолевых клеток рака груди человека *in vitro*;
6. оценка общей токсичности полученных микросфер в экспериментах *in vivo*.

Для получения локальных систем доставки лекарственных средств чаще всего применяют биodeградируемые полимеры из классов белки (желатин), полисахариды (целлюлоза и ее производные, хитозан, декстран), алифатические полиэфиры и многие другие. В своей работе в качестве полимерного носителя автор берет известный природный полимер микробного происхождения из класса полиоксиалканоатов – поли-3-оксибутират, обладающий высокой биосовместимостью, медленной биodeградацией, способностью разлагаться до нетоксичных для организма веществ (CO_2 и вода). Отдельного внимания заслуживает разработка методики и получение в работе высокоочищенного ПОБ.

Научная новизна представленной работы связана с получением противоопухолевых лекарственных систем в виде микросфер на основе поли-3-оксибутирата методом одноэтапного эмульгирования с включением различных цитостатических препаратов. Полученные лекарственные формы характеризуются контролируемым высвобождением иммобилизованных веществ, меньшей токсичностью для всего организма и большей эффективностью (микросферы с паклитакселом), по сравнению с традиционной лекарственной формой (Таксол), что доказано в экспериментах *in vitro*, *in vivo*. Автором также были получены магнитоуправляемые системы с добавлением наночастиц оксида железа для транспорта и адресной доставки противоопухолевых веществ к пораженным органам и тканям. Для целей диагностики онкопатологии были получены микросферы с добавлением наночастиц золота.

Практическая значимость работы Е.В. Филатовой связана с возможностью получения биodeградируемых безопасных эффективных микросфер с цитостатиками на основе природного полимера – поли-3-оксибутирата. Результаты работы могут послужить основой для создания новых отечественных малотоксичных противоопухолевых лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением. Возможность доставки лекарства в определенный орган с равномерной скоростью в течение продолжительного действия расширит лечебные и диагностические возможности химиотерапии. Применение таких препаратов будет иметь важный медико-социальный эффект – позволит проводить длительную химиотерапию без многократного введения препарата, а снижение токсичности и уменьшение побочных эффектов улучшит качество жизни пациента.

Диссертационная работа Е.В. Филатовой изложена на 166 печатных страницах, содержит 75 рисунков, 9 таблиц. Работа состоит из введения, трех глав, содержащих литературный обзор, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка литературы из 206 источников, из которых 185 зарубежных.

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, обозначены научная новизна, научно-практическая значимость работы, перечислены методы исследования, представлены положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации работы, указан личный вклад автора в исследование.

Первая глава посвящена литературному обзору. Автор подробно рассматривает основные фармакокинетические параметры, на которые необходимо ориентироваться при получении и применении биополимерных лекарственных форм нового поколения с модифицированным высвобождением цитостатиков – препаратов третьего и четвертого поколения, не оказывающих побочных и токсических эффектов на внутренние органы. Приводится классификация лекарственных форм с модифицированным высвобождением, описываются принципы их действия. Автор анализирует работы по получению лекарственных форм с модифицированным высвобождением различных препаратов – противотуберкулезных, противовоспалительных, химиотерапевтических, антибиотиков, гормонов, генов. Особое внимание уделяется методам получения полимерных микросфер; требованиям к микросферам как к системам местной доставки лекарственных веществ, в том числе цитостатиков; механизмам высвобождения лекарств; факторам, влияющим на высвобождение препаратов; способам получения систем адресной доставки лекарств с применением биополимерных наночастиц, наночастиц металлов. Проводится обзор зарубежных работ по получению и изучению эффективности микросфер на основе разных полимеров с контролируемым высвобождением цитостатиков. Отечественные работы по созданию новых форм полимерных химиотерапевтических препаратов связаны, преимущественно, с получением липосомальных форм цитостатиков. Автор анализирует различные методы оценки *in vitro*, *in vivo* биологической безопасности полимерных систем с цитостатиками, применяемые в мировой практике. Приводятся свойства синтетических и природных биodeградируемых полимеров, главным образом, полилактидов, полигликолидов, полиоксиалканоатов, применяемых в качестве систем доставки лекарств.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» представлена информация об используемых в работе материалах: штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* 7Б, химиотерапевтические препараты, иммобилизованные в матрицу - паклитаксел, этопозид, метотрексат, дексаметазон, хлорамбуцил, доксорубин. Описаны применяемые в работе методы исследования основных физико-химических свойств полученных лекарственных форм, морфологии поверхности микросфер, их биосовместимости, безопасности, химиотерапевтической активности – спектрофотометрия, вискозиметрия, световая микроскопия, сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, исследования с применением клеточных культур линии MFC 7. Подробно описаны методика получения высокоочищенного ПОБ, методика получения микросфер путем одноэтапного эмульгирования с включением цитостатических препаратов.

В третьей главе автором подробно изложены полученные экспериментальные результаты *in vitro*, *in vivo* и их обсуждение. Показаны возможности получения: а) магнитоуправляемых микросфер на основе поли-3-оксибутирата с включением в матрицу наночастиц оксида железа Fe₂O₃; б) микросфер с добавлением наночастиц золота, что имеет

важное значение для диагностических целей; в) микросфер с контролируемым высвобождением различных противоопухолевых препаратов: паклитаксел, этопозид, метотрексат, дексаметазон, хлорамбуцил, доксорубин (в объеме $10 \pm 3\%$).

Сравнительная оценка кинетики высвобождения иммобилизованных в полимерную матрицу цитостатиков в водной среде позволила выбрать наиболее оптимальный лекарственный препарат – паклитаксел, имеющий пролонгированное высвобождение. В течение 60 суток у паклитаксела высвобождение составило 40%, у этопозиды - 70%, полное высвобождение (до 90%) наблюдалось у хлорамбуцила и дексаметазона. Наибольший выход препарата в первые сутки («взрывной эффект») наблюдался у хлорамбуцила (78%) и дексаметазона (72%) – эти препараты имели менее длительный период пролонгированного высвобождения – до 30 суток. Наименьшее количество выхода было отмечено у доксорубина (2%), паклитаксела (5%), у метотрексата – 11%, у этопозиды – 16%. Эти препараты имели более плавный выход препарата в начале высвобождения и более пролонгированное по длительности высвобождение – более 60 суток. За счет пролонгированного выделения цитотоксическая концентрация не достигается, что способствует уменьшению побочных и токсичных эффектов препаратов.

Автором показано, что гидролитическая деструкция микросфер на сроках наблюдения 90 суток протекает медленно. Это способствует пролонгированному выделению лекарственных препаратов.

В работе доказана химиотерапевтическая эффективность, биосовместимость, нетоксичность полученных противоопухолевых микросфер на основе поли-3-оксибутирата в экспериментах *in vitro* с применением культур опухолевых клеток линии рака груди человека MFC-7. Наиболее выраженную пролонгированную противоопухолевую активность имели микросферы с паклитакселом. Противоопухолевая активность сохранялась свыше 45 суток.

В экспериментах *in vivo* на мелких животных (мышах) микросферы с паклитакселом проявили малую токсичность на организм. Был сделан вывод, что полученная лекарственная форма с паклитакселом обладает длительным контролируемым высвобождением при сохранении высокой эффективности, а также является малотоксичной.

Заключение содержит краткое описание полученных результатов, обсуждаются перспективы развития направления противоопухолевой терапии.

Все поставленные в работе задачи успешно выполнены, что отражено в **выводах**.

Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют о перспективности продолжения этих исследований. Результаты работы могут быть использованы для создания новых лекарственных форм этопозиды, паклитаксела и хлорамбуцила (в том числе двойной лекарственной формы) с контролируемым высвобождением. Автором предложена новая форма адресной доставки токсичного препарата Таксол.

Основная часть результатов отражена в публикациях и апробирована на профильных конференциях. По теме диссертации опубликовано 11 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, 4 обзора, 13 тезисов в сборниках статей по материалам конференций.

Научные исследования проведены автором с применением современных методов оценки – световая микроскопия, сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия, спектрофотометрия, исследования с применением клеточных культур.

Текст диссертации и автореферат написаны доступным языком, материал изложен четко, последовательно. Диссертант хорошо ориентируется в проблеме биомедицинских полимеров и полимерных лекарственных форм.

Автореферат достаточно полно отражает основное содержание диссертации и полученные результаты.

Существенных замечаний к работе нет. Есть **некоторые рекомендации и отмечены незначительные недостатки:**

- в работе встречаются досадные грамматические ошибки, опiski, например, стр. 29, 36, 37, 43, 46, 47, 52, 54-56, 60, 64, 83, 86, 88;

- содержание подраздела 4.2.2 «Учет особенностей и свойств полимеров при создании систем пролонгированного высвобождения лекарственных веществ» касается особенностей и свойств полимеров «вообще», и поэтому не совсем соответствует заголовку раздела 4.2 «Природные биodeградируемые материалы — полиоксикалкоаноаты». Подраздел 4.2.2 целесообразно было бы выделить в отдельный раздел, например, 4.3;

- рис. 7 не имеет расшифровку сокращений;

- названия таблиц следовало помещать над таблицами;

- в методах исследования – стр. 9, 78 автор пишет об оценке биodeградации. Правильно было бы говорить о гидролитической деструкции, так как оценка деградации микросфер проводилась в фосфатном буфере, вне живого организма;

- повтор информации, касающейся описания паклитаксела – п.2.5 и п.4.2;

- очень поверхностно затронут вопрос о стерилизации микросфер - «Предварительно сухие микросферы стерилизовали при 100°C в течение 10 минут». Как подтверждалась стерильность?

- следовало больше внимания уделить эксперименту *in vivo*: оценка сроков биodeградации, сравнение полученных микросфер с импортными аналогами, имплантация животным и оценка действия магнитоуправляемых систем.

Однако все сделанные замечания носят рекомендательный характер и не влияют на положительную оценку диссертации.

Заключение. Диссертация Е.В. Филатовой на тему «Лекарственные системы противоопухолевого действия на основе микросфер из поли-3-оксибутирата», представляет законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на актуальную тему

получения новых противоопухолевых биополимерных лекарственных форм с контролируемым высвобождением. Результаты диссертации сочетают научную ценность с большой практической значимостью. Работа носит комплексный характер, выполнена на стыке биохимии, биотехнологии, медицины, ориентирована как на фундаментальные исследования, так и на практические задачи клинической терапии онкозаболеваний. Результаты диссертационной работы Е.В. Филатовой могут быть использованы в практике научных организаций, деятельность которых связана с созданием биополимерных лекарственных форм пролонгированного действия или с исследованием свойств биополимеров, предприятий биотехнологического и медицинского профилей, а также в фарминдустрии.

Диссертационная работа Е.В. Филатовой в полной мере отвечает всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям (п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней"), а её автор, Елена Викторовна Филатова заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия.

Доктор биологических наук, профессор,
Заведующая лабораторией химии и технологии
материалов для сердечно-сосудистой хирургии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр
сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: 121552, Москва, Рублевское шоссе, 135,
тел: +7 (495) 414-79-44,
e-mail: spnovikova@bakulev.ru
Новикова Светлана Петровна

« 15 » мая 2019г.

Подпись д.б.н., профессора
Новиковой Светланы Петровны заверяю
д.м.н., ученый секретарь ФГБУ НМИЦ ССХ
им. А.Н. Бакулева Минздрава России
Сокольская Надежда Олеговна

