

## Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Филатовой Елены Викторовны "Лекарственные системы противоопухолевого действия на основе микросфер поли-3-оксибутирата», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

### Актуальность

В современном мире онкологические заболевания представляют одну из наиболее острых глобальных угроз здоровью и жизни человека *\*став (по данным ВОЗ) в 2018 г. причиной смерти ~10 млн. жителей планеты*. Накопление генетических дефектов с ростом, как продолжительности жизни, так и техно-онкогенной загрязненности жизненной среды, в сочетании с подверженностью населения к соблазнам потребительских удовольствий *(в питании, курении ...)* в ущерб разумной гигиене, ведут к неуклонному росту рисков недоброкачественных новообразований. В ряду мер лечебно-медицинского противостояния раку одну из ключевых позиций занимает химиотерапия (ХТ). Однако, несмотря на значительные успехи, используемые сегодня в онкологии, в основном цито-токсические/статические, препараты не отличаются достаточно высокой селективностью целевого воздействия только на опухолевые клетки. Велика угроза существенного побочного ущерба, особенно в концентрациях, превышающих допустимый ХТ коридор. Жизненно необходимыми в этой связи становятся разработки таких лекарственных форм (ЛФ), которые обеспечивают оптимально регулируемый концентрационный режим адресно-локальный дозировки лекарственных веществ (ЛВ). Именно этой, безусловно, актуальной и практически важной задаче, как раз и посвящена работа Л.В. Филатовой.

Основная идея и цель работы заключается в разработке оригинальных ЛФ на основе инкапсуляции ЛВ в микросферы (МСФ), формируемые с использованием преимуществ поли-3-оксибутирата (ПОБ) – биосовместимого природного полимера, получаемого из бактериальной культуры по отечественной методологии (ИНБИ РАН).

### Общая характеристика работы

Диссертация имеет традиционную структуру и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), обсуждения результатов (глава 3), заключения, выводов, списка литературы, благодарностей. Работа изложена на 166 страницах, содержит 9 таблиц, 75 рисунков, список литературы включает 206 ссылок.

*Во Введении* обоснована актуальность темы, отмечен круг нерешенных проблем, сформулированы цель и задачи собственного исследования, охарактеризованы научная

новизна и практическая значимость работы, приведены сведения о её апробации и публикациях по теме диссертации.

*В первой главе* представлен *обзор литературы* в области биохимических основ, экспериментальной и клинической медицины микро- и нано-размерных ЛФ длительно регулируемой и адресной дозировки инкапсулированных ХТ-соединений. Рассмотрены классификация и отличительные характеристики ЛФ модифицированного высвобождения ЛВ, микросферы-депо и нано-частицы направленной (в т. ч. магнитоуправляемой) доставки-дозирования цитостатиков. Описаны известные примеры получения, свойств и применения соответствующих ЛФ на основе преимущественно биогенных и родственных полимеров, обеспечивающих био- доступность и совместимость, длительную стабильность, выделение и терапевтическую эффективность ЛВ, а затем – возможность естественной деструкции и выведения из организма. Рассмотрены, методы, уровни и критерии оценки биобезопасности новых ЛФ, а также перспективы развития биodeградируемых материалов в медицине. В заключении приведены данные о происхождении, структуре, свойствах и преимуществах бактериально-продуцируемых полиоксиданов, включая ПОБ. Обзор дает полное представление об актуальном состоянии проблемы в целом и целесообразности концентрации внимания именно на ПОБ, как потенциально перспективной основы создания оптимально эффективных и нетоксичных противоопухолевых ЛФ.

*Во второй главе («Материалы и методы исследования»)* описаны штамм-продуцент ПОБ, методы получения и очистки ПОБ, определения его молекулярной массы. Охарактеризован перечень ЛВ, инкапсулируемых в матрицу ПОБ, описаны процедуры получения микросфер (МСФ) ПОБ+ЛВ, исследования высвобождения ЛВ, оценки химиотерапевтической активности и дегградации *in vitro*, а также острой токсичности МСФ *in vivo*. Рассмотрены инструментальные методы оптической сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. В целом, методический уровень работы не оставляет сомнений в достоверности её результатов.

*Третья глава* посвящена рассмотрению и обсуждению результатов собственных исследований соискателя, их анализу и интерпретации.

*В разделе 1* описаны полученные методом одноэтапного эмульгирования пробные образцы МСФ ПОБ, содержащие наночастицы золота или оксида железа на перспективу разработки магнитоуправляемых и диагностических препаратов.

*Разделы 2-5* посвящены получению и изучению опытных партий МСФ бинарного состава ПОБ+ЛВ для противоопухолевой ХТ. Разработка типовой методологии формирования, сепарации и очистки образцов обеспечила получение опытной серии МСФ, сопоставимых

по размерам ( $40 \pm 10$  мкм) и содержанию ЛВ ( $10 \pm 3\%$  масс.), но различных по молекулярной природе и активности ЛС достаточно представительного ряда: дексаметазон (ДМ), доксорубин (ДР), метотрексат (МТ), паклитаксел (ПТ), этопозид (ЭП) и хлорамбуцил (ХФ). Такой экспериментально грамотный подход, позволил изучать не только индивидуальные варианты МСФ, но и проводить их корректные сравнительные исследования в прямой зависимости от типа инкапсулированного ЛС, что крайне важно для медицинской практики. Препараты МСФ подробно охарактеризованы по размерам, форме и морфологии, а также по кинетическим профилям высвобождения ЛВ в тщательно воспроизводимых (равных) условиях *in vitro* (фосфатный буфер, pH 7,7, 37°C) (раздел 2). Сравнительный анализ (раздел 3) обнаружил ряд интересных и практически важных закономерностей скорости выхода ЛВ в зависимости от типа ЛВ. Выявлено 2 подгруппы МСФ: 1) изначально быстрого - «взрывного» высвобождения ЛВ (ДМ и ХА) и 2) слабо выраженного взрывного эффекта, но длительного (до 110 суток) высвобождения (ДР, ПТ, МТ и ЭП). Вторая подгруппа, предотвращая опасные передозировки и способствуя режиму длительного поддержания ХТ-достаточных концентраций ЛВ, обоснованно оценивается диссертантом, как более соответствующая задачам ХТ. Обнаружив указанные различия, автор переходит к прояснению теоретических основ наблюдаемых явлений. На базе теории диффузии по законам Фика в их модельно-математических и полуэмпирических приближениях к исследуемым объектам диссертантом с высокой степенью корреляции получены искомые представления о механизмах и расчетные параметры (в т. ч. коэффициенты диффузии) этапов выхода ЛВ. Начальный взрывной эффект – модель кинетики «0» порядка, пролонгированное высвобождение – «~0,5» порядка, и завершающий этап – «1» порядка, с разрушением матрицы ПОБ, как ограничительного барьера свободной диффузии ЛВ. Соответственно в разделе 4 исследован аспект гидролитической деструкции ПОБ-матрицы и деградации МСФ. В завершении (раздел 5) репрезентативная группа МСФ протестирована на противоопухолевую<sup>(модель рака груди человека)</sup> ХТ-активность и биосовместимость *in vitro*, а наиболее перспективная пред-ЛФ на основе ПОБ+ПТ МСФ – также на острую токсичность *in vivo* (мыши).

В итоге развернутого системного исследования диссертант создает научно-теоретическую и методическую основу целенаправленной разработки оригинальных ЛФ, получая на выходе бинарно-компонентные микросферические системы (ПОБ+ЛВ) существенно превосходящие по критериям ХТ-эффективности, стабильности, биосовместимости и –безопасности известные коммерческие препараты (такие как Таксол).

**Научная новизна** работы Филатовой Е.В. заключается в том, что вышеуказанные целевые разработки оригинальных микросферических ЛФ (с применением отечественного биополимерного материала ПОБ в комбинации с противоопухолевыми ЛВ) обоснованы, реализованы до экспериментальных образцов, и исследованы **впервые**.

Впервые для такого типа систем получены данные по морфологии, кинетическим профилям, ХТ-эффективности, био-совместимости и деградации (*in vitro*), а также острой токсичности (*in vivo*). Выявлен ряд зависимостей их терапевтически-существенных параметров от молекулярной природы ЛВ. Оценены механизмы и математические модели регуляции скоростей высвобождения инкапсулированных ЛВ.

**Практическая значимость** работы заключается в том, что её результаты приводят к научно-обоснованным прогнозам существенного улучшения целевой ХТ-эффективности и снижения токсикологических рисков на пути продвижения новых МСФ (ПОБ+ЛВ)-типа в практику современной противоопухолевой терапии. В частности, результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания новых малотоксичных ЛФ этопозида и хлорамбуцила (в т. ч. двойной лекарственной формы) с контролируемым высвобождением. МСФ с включением паклитоксела, оптимизируя профиль пролонгированного высвобождения ЛВ, имеют все предпосылки для замещения в будущем импортного препарата Токсол на отечественную разработку диссертанта.

Представленные в диссертации результаты, научные положения, выводы и обобщения являются достоверными и обоснованными. Они подтверждаются большим объемом экспериментального материала, полученного с использованием комплекса современных микробиологических, физических, физико- и био-химических методов.

Признавая в целом высокий научный уровень, тщательность и достоверность выполненной работы, следует, тем не менее, отметить ряд замечаний.

1. **Начиная с литературного обзора**, текст диссертации несколько перегружен повторами, например, относительно типичных недостатков традиционных и преимуществ разрабатываемых диссертантом ЛФ по всем частным примерам. Более компактное изложение с заключениями и прогнозами не по эпизодам, а обобщенно – по ключевым разделам облегчило бы целостное восприятие материала, тем более что обзор представлен логически последовательно и достаточно полноценно.

## 2. Глава 2 – *Материалы и методы*

**Раздел 4** – оценка молекулярной массы (М) ПОБ только методом вискозиметрии представляется недостаточной, так как не дает представления о широте разброса по молекулярно-массовому распределению (ММР), что может быть существенным в

регуляции свойств микросфер. В этой связи и с учетом требований к стандартизации полимеров медицинского назначения, определение ММР было бы полезным, например, методами хроматографии.

**Раздел 6** – в перечне использованных ХТ «препаратов» отсутствуют сведения, являются ли они индивидуальными соединениями и какой степени чистоты.

**Раздел 10** – отсутствуют данные о происхождении, размерах и иных характеристиках исходных «наночастиц» золота и оксида железа, использованных в работе.

### 3. Глава 3 – Результаты и обсуждение

**Раздел 1.1.** рассматривает разработки микросфер с метал-содержащими наночастицами, в т. ч., ориентированные на перспективу средств магнитоуправляемой адресной доставки ЛВ – на примере оксида железа III формулы  $Fe_2O_3$ . Однако для заявленной задачи выбор именно такой формы окислов железа представляется нецелесообразным, так как обе стабильные модификации  $Fe_2O_3$  ( $\alpha$  – ферромагнетик, но слабый, и  $\gamma$  – ферримагнетик) не имеют значительной восприимчивостью к магнитному полю. Логичнее было бы апробировать наночастицы магнетита -  $Fe_3O_4$  (железа II/III, 1:2) – сильного ферромагнетика.

**Раздел 2** – в первых строках раздела в качестве ЛВ, оптимального для инкапсуляции, обозначен Таксол. Здесь, видимо, опечатка, поскольку Таксол это не ЛВ, а, как упоминал и сам диссертант, лекарственная форма *наклитаксела* – раствор ЛВ (~6%).

**Раздел 3** – обсуждая механизмы выявленных различий в кинетике высвобождения разных ЛВ из микросфер ПОБ, диссертант делает акцент, преимущественно на гидрофильные (в т.ч., водородные связи) и гидрофобные взаимодействия молекул ЛВ с ПОБ. Однако, недостаточное внимание уделено соотношению размеров молекул ЛВ. Увеличение размера (M) должно сказываться на скорости диффузионного выхода ЛВ из МСФ. Так, ускоренный выход более низкомолекулярных ЛВ заметен, в целом, на рис. 57 и в однозначно явной форме – на рис. 61.

**Раздел 4** – при обсуждении гидролитической стабильности микросфер с разными ЛВ обнаруживаются факты отличий в скоростях деструкции ПОБ. Однако комментарии (пусть гипотетические) о возможной связи с химической природой ЛВ отсутствуют. Так, молекулы ЛВ, особенно кислотные, могут служить фактором каталитического ускорения гидролитической деструкции полиэфирных цепей, что могло бы стать одним из объяснений заметно ускоренной деструкции МСФ с хлорамбуцилом (рис. 67).

Кроме того, ввиду присутствия в организме ПОБ-расщепляющих ферментов, в опытах *in vitro* полезно было бы не ограничиваться упрощенной моделью среды в виде

фосфатного буфера, а хотя бы выборочно, апробировать аналогичные среды с добавками соответствующих энзимов. Были ли такие попытки?

4. **Текст диссертации** и автореферата не свободен от некоторых неудачных формулировок, неточностей, или, возможно, опечаток, например:

**Стр. 37** – при описании эксперимента *in vivo* читаем: «на мышцах Эрлиха» (такой линии мышцей нет), видимо, имелось в виду: «на мышцах **с карциномой Эрлиха**»?

**Стр. 41** – «инкапсулированную эффективность Этанидазола»... Эффективность не может быть инкапсулированной;

**Стр. 8,10,88,124,127,141** – словосочетание «наиболее оптимальный» представляется не совсем корректным, поскольку сам термин «оптимальный» уже характеризует объект или явление как однозначно наиболее соответствующий условиям/задачам.

#### 5. **Рисунки:**

**Рис. 3,4** – пропущены градуировка и/или единицы измерения по осям;

**Рис. 10,15,19** – подписи к осям графиков не на русском языке;

**Рис. 33,38,46,51,56,66** – кривая скорости высвобождения ЛВ, быстро падая, почти сливается с осью абсцисс, и далее становится трудно различимой. Нельзя ли было улучшить читаемость графиков, заменив развертку шкалы ординат, например, на логарифмическую?

6. **Излишнее употребление русскоязычных имитаторов англоязычных терминов** вместо их ясных эквивалентов на русском языке.

Типичный пример: для обозначения быстрого высвобождения ЛВ англоязычный термин “burst effect” диссертант употребляет (18 раз) как «берст эффект». Грамотнее использовать вполне понятный русский эквивалент (употреблен 12 раз) - **взрывной** (дав сноску: на английском - “burst”) **эффект**. Аналогично, метод «эвапорации» по-русски означает метод «упаривания» (удаления растворителя). Замедляющие (“retard”), но не «ретард» (стр. 22-23) ЛФ, и т.д.

Это важно для подъёма отечественной науки – с позиций ведомого мировых достижений, на уровень устремлённости молодых ученых к **самостоятельному лидерскому мышлению, свободному от формально-подражательной зависимости** там, где русский язык вполне достаточен и ясен для понимания и отражения сути.

Однако приведенные замечания носят частный, дискуссионный или рекомендательный характер, не затрагивая существа работы, её актуальности, новизны, практической ценности, и научно-квалификационного уровня.

## Заключение

Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертация Филатовой Е. В. «Лекарственные системы противоопухолевого действия на основе микросфер поли-3-оксибутирата» по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности, научной новизне и практической значимости является законченной научно-квалификационной работой. Автором получены результаты, вносящие существенный вклад в развитие научно-теоретических и методологических основ разработки биосовместимых микросферических систем управляемо-продолжительной и адресной дозировки лекарств с оптимальной химиотерапевтической эффективностью и минимальными рисками побочной токсичности. Основные результаты работы опубликованы в 11 статьях в журналах из перечня ВАК, 4 обзорах, 13 тезисах докладов на международных и российских конференциях. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Диссертация соответствует паспорту заявленной специальности 03.01.04 (пп. 5, 6, 16, 17) и полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 29 сентября 2013 № 842, а её автор, Елена Викторовна Филатова, безусловно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Главный научный сотрудник лаборатории химии полиэлектролитов и медико-биологических полимеров Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ордена Трудового Красного Знамени Института Нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук,

доктор химических наук, доцент  
[serbin@ips.ac.ru](mailto:serbin@ips.ac.ru)  
телефон 495 647 59 27 доб. 331  
119991, Москва, Ленинский проспект 29

А. В. Сербин

Подпись А. В. Сербина заверяю  
ученый секретарь ИНХС РАН  
кандидат химических наук  
«17» 05 2019 г.



Ю. В. Костина