

УТВЕРЖДАЮ:

Ректор федерального государственного
автономного образовательного учреждения
высшего образования «Национальный
исследовательский университет ИТМО»,
доктор технических наук, профессор,
член-корреспондент РАН



Васильев Владимир Николаевич

« 11 » ноября 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

на диссертационную работу Гусяковой Ольги Игоревны «Биораспределение и деградация микронных и субмикронных частиц ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения», представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика

Диссертация Гусяковой Ольги Игоревны посвящена рассмотрению особенностей биораспределения в живом организме мелких лабораторных грызунов микро- и субмикронных частиц ватерита под действием биофизических процессов при интратрахеальном, внутривенном и интрафолликулярном введении.

Актуальность темы исследования

Область разработки систем доставки лекарственных средств в настоящее время является одной из наиболее динамично развивающихся областей научных исследований на стыке биологии, физики, химии и других наук. Использование систем доставки способно кардинально менять характер транспорта и локализации терапевтических молекул при введении в живые системы, как на клеточном уровне, так и на уровне органов/тканей и организма в целом. В качестве основных факторов, контролирующих адресность носителей, выделяют, во-первых, их физико-химические параметры, такие как размер, форма, жесткость, поверхностный заряд и др., во-вторых, дополнительную поверхностную функционализацию направляющими векторами для обеспечения специфического лиганд-рецепторного взаимодействия носителей и клеток патологических тканей, и, в-третьих, особенности биофизических процессов, протекающих в пораженных различными заболеваниями тканях.

Среди большого числа изучаемых на сегодняшний день систем доставки (липосомы, микро- и наночастицы органической и неорганической природы и т.д.) выделяются частицы карбоната кальция в кристаллографической фазе ватерита благодаря биосовместимости,

пористости, обеспечивающей высокую загрузочную емкость, возможности растворения в средах со слабощелочным рН, которые соответствуют содержанию лизосом и микроокружению опухолевой ткани, пролонгированному высвобождению носителя из частиц. Несмотря на наличие большого числа работ, посвященных изучению распределения и специфики высвобождения модельных и лекарственных средств при различных методах адресации с использованием частиц ватерита, остались малоизученными вопросы влияния биофизических процессов в живом организме на биораспределение частиц ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения и динамику деградации частиц ватерита. Понимание указанных вопросов является ключевым фактором в разработке стратегий терапии и диагностики с использованием частиц ватерита, как носителей, обеспечивающих эффективное и безопасное применение. В связи с чем задача выявления биофизических закономерностей распределения и деградации частиц ватерита при пассивной адресации в альвеолярную часть легких при интратрахеальном введении, в кровеносные сосуды привитой подкожно аденокарциномы при внутривенном введении, и в волосяные фолликулы при наружной аппликации является актуальной, а результаты, изложенные в диссертационной работе Гусликовой О.И. соответствуют современным тенденциям в предметной области.

Научная новизна

1. Впервые показана возможность эффективной адресной доставки частиц ватерита субмикронного размера (0.65 ± 0.17 мкм) в альвеолярную часть легких мыши при интратрахеальном введении вследствие преимущественного влияния процесса диффузии на движение частиц малого размера в потоке и малых чисел Стокса.
2. Успешно продемонстрирована доставка фермента барназа с использованием формуляции на основе частиц ватерита (300–500 нм), покрытых аптамером к ЕрСАМ, в альвеолярную часть легких после интратрахеальной инстилляцией, и удержание в целевом органе за счет взаимодействия между лигандом (аптамером) и рецептором (ЕрСАМ).
3. Продемонстрировано замедление диссоциации и перекристаллизации частиц ватерита ($0,65 \pm 0,17$ мкм) в случае их инкубирования с двумя фракциями бронхоальвеолярного лаважа мышей *in vitro*, что связано с адсорбцией компонент лаважа на поверхность частиц и затруднением выхода ионов Ca^{2+} .
4. Проанализированы биофизические аспекты, способствующие адгезии частиц ватерита, содержащих молекулы порфиразина (агент фотодинамической терапии), к эндотелию капилляров опухоли. К таким аспектам отнесены аномалии сосудистой сети, ведущие к замедлению скорости кровотока и возможности накопления носителей в извилистой кровеносной сети, с последующим высвобождением лекарственного средства, которое частично проникает из капилляра в интерстициальное пространство опухоли.
5. Создана математическая модель и выполнено численное моделирование зависимости концентрации порфиразина в интерстициальном пространстве опухоли на фиксированном расстоянии от капилляра ($r = 50$ мкм) во времени. Также проведено сравнение с ранее предложенной моделью медленно высвобождающих частиц, полученных из сополимера молочной и гликолиевой кислот.

6. Доказана высокая эффективность ингибирования роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* при использовании частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином по сравнению со свободной формой этого антимикотика благодаря эффекту длительного высвобождения.
7. Экспериментально продемонстрировано проникновение и длительная деградация частиц ватерита с противогрибковым препаратом (нафтифин) вдоль волосяного фолликула мыши после нанесения суспензии на кожу и применения терапевтического ультразвука (с частотой 1 МГц, мощностью 0,5 Вт/см² и продолжительностью воздействия 3 минуты).

Практическая значимость

К практическим результатам данной работы можно отнести подтверждение ряда преимуществ субмикронных пористых частиц ватерита при адресации в различные органы и ткани, что может быть учтено при разработке тактик и стратегий терапии ряда заболеваний. Во-первых, при разработке методик терапии заболеваний легких можно использовать иммобилизацию лекарственного вещества в частицах ватерита в качестве матрицы-носителя с высвобождением препарата только после достижения дыхательных путей. Часть патофизиологии многих заболеваний легких выражается в наличии воспаления в этих областях, и возможность длительного высвобождения лекарственного препарата из частиц ватерита в альвеолярном пространстве сможет повысить эффективность лечения. Дополнительная модификация поверхности частиц ватерита с оболочкой, содержащей фермент барназа, направляющим вектором может быть применена для лечения раковых заболеваний и вирусных инфекций, включая коронавирусные заболевания у человека. Результаты, полученные в ходе исследования накопления частиц ватерита в подкожно привитой опухоли после внутривенного введения и последующего быстрого высвобождения порфиразина, могут быть использованы для усовершенствования тактик терапии онкологических заболеваний с высокотоксичными препаратами, поскольку такие лекарственные формы способны обеспечить локально в опухоли высокую концентрацию иммобилизованного лекарства.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 264 источника. Общий объем диссертации составляет 196 страниц, включая 63 рисунка и 4 таблицы.

Во введении представлено обоснование актуальности проведенных исследований, раскрыта их новизна и практическая значимость, а также сформулированы цель и задачи работы.

В первой главе представлен обзор научной литературы, посвященный методам синтеза частиц ватерита, модификации их поверхности с целью расширения функциональности носителей, созданных на их основе. Приведены примеры из современной литературы применения частиц ватерита для терапии и диагностики. Описаны преимущества использования частиц ватерита при различных способах введения, включая пероральное, внутривенное, трансдермальное, внутрилегочное, внутрибрюшинное,

интраназальное, внутриопухолевое введение, а также имплантацию в составе тканеинженерных конструкций.

Во второй главе содержится описание всех материалов и методов, использованных при проведении исследований и последующей обработке данных. Приведено описание методик получения частиц ватерита различного размера, иммобилизации модельных высокомолекулярных веществ и терапевтических агентов, а также расчет эффективности инкапсуляции, проведения экспериментов на клетках и животных, как *in vivo*, так и *ex vivo*.

Третья глава посвящена исследованиям распределения и длительности накопления частиц ватерита трех размеров ($0,65 \pm 0,17$ мкм, $1,35 \pm 0,16$ мкм и $3,15 \pm 0,60$ мкм) в альвеолярном пространстве легких после интратрахеального введения и влиянию дополнительной функционализации структур «ядро-оболочка», содержащих фермент барназа, направляющей молекулой (аптамер к EpCAM) на удержание в целевой области. Частицы трех размеров достигали легких и, как следствие, доставляли иммобилизованное вещество (конъюгат альбумина и цианина 7), в тело животных. Однако частицы размером $0,65 \pm 0,17$ мкм обеспечили самую эффективную аккумуляцию флуоресцентного сигнала в органе-мишени в течение 72 часов. Частицы размером $0,65 \pm 0,17$ мкм проникли в легкие и достигли альвеолярной области согласно данным флуоресцентной микроскопии криосрезов целевого органа. Было установлено, что при взаимодействии частиц ватерита диаметром $0,65 \pm 0,17$ мкм с компонентами бронхоальвеолярного лаважа после 6 суток инкубации *in vitro* не происходит их полного растворения и перекристаллизации, в то время как полный переход частиц карбоната кальция из ватеритной в кальцитную полиморфную модификацию при инкубации в воде и физиологическом растворе составляет менее суток. Наблюдаемая разница в скорости растворения и перекристаллизации может быть объяснена адсорбцией и формированием «короны» на поверхности частиц ватерита компонентами легочного флюида (белками, фосфолипидами). Был продемонстрирован подход к повышению эффективности использования фермента, вызывающего гибель раковых клеток за счет возможности многократной загрузки частиц ватерита ($0,55 \pm 0,12$ мкм) и модификации их поверхности вектором, специфичным к EpCAM для адресации. Рассчитанная на основе анализа гистологических срезов тканей легких средняя поверхностная концентрация частиц после их введения показывает, что наличие на поверхности векторных молекул позволяет сохранить в целевом органе больше носителей ($2,3 \times 10^3$ мм⁻²) по сравнению с немодифицированными носителями ($1,3 \times 10^3$ мм⁻²).

В четвертой главе рассмотрено влияние биофизических параметров аномальной сосудистой сети опухоли, характеризующейся медленной скоростью кровотока, на пассивное накопление частиц ватерита размером $0,47 \pm 0,14$ мкм, нагруженных фотодинамическим агентом (молекулами порфиразина) после внутривенной инъекции частиц. Показано, что исследуемые частицы прикреплялись к эндотелию капилляров и высвобождали порфиразин, который распространяется из капилляра в интерстиций опухоли. Быстрое высвобождение лекарства из частиц в данном случае представляло собой ключевое преимущество. Численное моделирование изменения концентрации вещества $C(r,t)$ от времени на фиксированном расстоянии от капилляра ($r = 50$ мкм) продемонстрировало, что быстрое высвобождение порфиразина из ватеритных частиц обеспечивает проникновение значительно большего количества вещества в интерстиций опухоли по сравнению с медленно высвобождающимися частицами на основе PLGA.

В пятой главе показано, что временем высвобождения функциональных молекул (микотического средства) из частиц ватерита можно управлять за счет адсорбции полимеров на поверхность частиц. Так, максимальное увеличение времени высвобождения было достигнуто при нанесении оболочки, включающей два бислоя полиаргинаина /декстран сульфата и терминальный слой гепарина. Также за счет варьирования наносимых полимеров была показана возможность увеличения эффективности захвата частиц клетками при крайне низкой цитотоксичности. В *in vitro* тестах на дрожжеподобных грибах *Candida* было зафиксировано непрерывное фунгицидное и фунгистатическое действие частиц ватерита с иммобилизованных антимикотиком за счет высокой степени загрузки и длительного высвобождения препарата из частиц. В *in vivo* тестах было получено подтверждение, что лекарственная форма на основе пористых частиц ватерита способна проникать на всю глубину волосяного фолликула и, как следствие, обеспечивать доставку лекарственного препарата в глубокие слои дермы.

В заключении представлены выводы, обобщающие результаты работы.

Вопросы и замечания по диссертации

Представленная работа содержит результаты комплексного исследования возможности и целесообразности применения частиц ватерита в качестве носителей различных функциональных молекул (люминесцентных красителей, фотодинамических агентов, микостатических препаратов). Диссертация написана хорошим языком, выводы и защищаемые положения сформулированы на основе большого объема корректно поставленных и проанализированных экспериментов *in vivo* и *ex vivo* с применением новейшего научного оборудования и современных методов анализа данных. Сильной стороной работы является достаточное разнообразие физико-химических подходов для изучения биофизических аспектов применения частиц ватерита в качестве систем адресной доставки целевого носителя.

Несмотря на все очевидные достоинства диссертационной работы Гуслияковой Ольги Игоревны, в работе отмечены следующие недостатки.

1. Зависимость концентрации целевого агента (в данном случае люминофора) в легких лабораторных животных (мышей) от размера частиц ватерита устанавливалась по интенсивности люминесценции комплекса БСА с флуоресцентным красителем Ци7. Такой подход является корректным при условии, что квантовый выход люминесценции красителя Ци7 не зависит от размера частиц ватерита, которые используются в качестве агента доставки. В общем случае оценка концентрации вещества по интенсивности его люминесценции представляется некорректной, поскольку этот параметр (интенсивность люминесценции) зависит и от концентрации, и от квантового выхода люминесценции.
2. Основные результаты работы получены с использованием частиц ватерита от 0,7 до 0,4 мкм. Из текста диссертации осталось невыясненным чем именно обусловлен выбор автором работы диапазона размеров частиц ватерита и может ли наблюдаться зависимость результатов от размеров частиц ватерита в указанном диапазоне?
3. Анализ кинетики люминесценции фотодинамического агента, молекул порфиразина, в водном растворе и сорбированного в частицах ватерита, выполненный в работе, показывает увеличение характерного времени затухания

люминесценции порфиразица, внедренного в частицы ватерита, по сравнению с водным раствором с 0,4 нс до 1,7 нс. В работе не приводятся данных об оптических и спектральных свойствах молекул порфиразица в водном растворе и в составе композитов на основе частиц ватерита. Это не позволяет сделать вывод о физических причинах наблюдаемого изменения кинетики люминесценции молекул и, как результат, спрогнозировать изменение эффективности применения порфиразица в качестве фотодинамического агента в составе частиц ватерита.

4. В работе показано, что величина ФДТ эффекта при сочетанном действии порфиразица в составе частиц ватерита и электромагнитного излучения оказывается немного ниже, чем при использовании порфиразица в свободной форме. Остается не вполне ясным наблюдаемое различие в эффективности ФДТ с физической точки зрения и связано ли данное различие в изменении квантового выхода генерации синглетного кислорода молекулами порфиразица при их внедрении в частицы ватерита.
5. Защищаемые положения диссертации сформулированы на основе результатов, полученных с использованием частиц ватерита, немного отличающихся друг от друга размером (0.65 ± 0.17 мкм, 0.47 ± 0.14 мкм, 0.55 ± 0.12 мкм). Насколько сформулированные в работе защищаемые положения корректны при изменении размеров частиц ватерита, например, с 0.65 ± 0.17 мкм на 0.47 ± 0.14 мкм?

Следует отметить, что высказанные замечания имеют рекомендательный характер и не снижают общего положительного впечатления от работы. В целом необходимо отметить, что диссертационная работа Гуслияковой О.И. является законченным научным исследованием, направленным на решение современных и актуальных задач обеспечения адресной доставки носителей лекарственных средств за счет рационального подбора параметров как самих носителей, так и методов их введения, учитывающего особенности биофизических процессов, проходящих в здоровых и патологических тканях. Гуслиякова Ольга Игоревна является соавтором 5 статей по тематике исследований, 4 из которых опубликованы в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus (Q1). Результаты работы О.И. Гуслияковой были представлены на российских и международных конференциях. 1 публикация представлена в сборнике материалов конференции, входящих в международную базу цитирования Web of Science; 6 публикаций в сборниках материалов конференций.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов подтверждается высокой воспроизводимостью полученных данных, их соответствием результатам других авторов и публикациям в современной литературе, а также прохождением критического рецензирования перед публикацией. Надежность экспериментальных результатов обеспечивалась использованием современного измерительного оборудования, сертифицированного в соответствии с международными стандартами качества, и применением стандартизированных методик измерений. Все выявленные закономерности, изложенные в работе, основаны на тщательном анализе полученных данных с использованием общепринятых статистических методов обработки.

Заключение

По актуальности решаемых задач, объему выполненных исследований, уровню их обсуждения и научной значимости диссертация О.И. Гуслияковой является законченным научным исследованием. Научные положения и результаты диссертации четко обоснованы. Автореферат дает полное представление о содержании диссертации.

Таким образом, актуальность исследований, новизна, достоверность и практическая значимость выводов, сделанных в диссертационной работе Гуслияковой Ольги Игоревны «» не вызывают сомнений. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание закономерностей распределения микро- и наноструктурированных носителей лекарственных препаратов и влияния носителя на физико-химические и функциональные свойства целевого агента. Диссертация отвечает требованиям п. 9-11, 13, 14, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук действующим Положением о присуждении ученых степеней, а автор диссертационной работы, Гуслиякова Ольга Игоревна, заслуживает присуждение ей ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Диссертация и отзыв обсуждены и одобрены на научном семинаре международного научно-образовательного центра физики наноструктур федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (протокол № 01 от 18.11.2024).

Отзыв составил:

Профессор международного научно-образовательного центра физики наноструктур, руководитель международной лаборатории «Гибридные наноструктуры для биомедицины», доктор физико-математических наук (Оптика), профессор



Орлова Анна Олеговна

18.11.2024

Сведения о ведущей организации:

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

Почтовый адрес: 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., д. 49, лит. А.

Телефон: +7 (812) 607-02-79

E-mail: od@itmo.ru

Официальный сайт организации: <https://itmo.ru>