

ОТЗЫВ

официального оппонента Букреевой Татьяны Владимировны
на диссертацию Гуслияковой Ольги Игоревны «Биораспределение и деградация
микронных и субмикронных частиц ватерита при интрафолликулярном,
интратрахеальном и внутривенном способах введения», представленной на
соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности
1.5.2 – Биофизика

Среди активно разрабатываемых в настоящее время новых средств доставки терапевтических и диагностических агентов хорошо зарекомендовали себя микро- и субмикрочастицы карбоната кальция кристаллической модификации ватерита и системы на их основе. Наряду с дешевизной материала и простотой синтеза, достоинствами таких систем является их биосовместимость, возможность биodeградации в кислых средах организма, высокая эффективность загрузки носителей и возможность регулируемого высвобождения загруженного вещества. Однако, несмотря на многочисленные работы по синтезу, исследованию структуры и свойств ватеритных носителей, ведущиеся различными научными группами (включая ученых Саратовского государственного университета) биофизические закономерности поведения этих частиц в живых системах были до сих пор мало изучены. Но без понимания механизмов функционирования носителей в живых организмах невозможно их применение в качестве реальной основы новых лекарственных и/или диагностических форм, в связи с чем выбранная тема диссертационной работы **высоко актуальна** и своевременна.

Диссертация построена по классической схеме – после введения следует литературный обзор, методическая часть, затем главы 3-5, посвященные результатам и их обсуждению, и заключение.

Литературный обзор логично выстроен, содержит всю необходимую информацию о способах синтеза микро- и субмикрочастиц карбоната кальция, их поверхностной модификации. Рассмотрены имеющиеся в литературе результаты исследований, полученные при различных способах введения частиц карбоната кальция лабораторным животным. Показана высокая перспективность частиц ватерита в качестве основы систем доставки в областях терапии и диагностики.

Методическая часть довольно большая и подробная. Это обусловлено высокой сложностью и комплексностью поставленных задач диссертационного исследования, возможность решения которых связана с использованием многочисленных **самых современных физических методов и физико-химических подходов**. Следует отметить, что используемые методики можно разбить на четыре типа: комплексное физико-химическое исследование самих частиц, изучение взаимодействия частиц с клетками различных типов, затем исследования на уровне тканей и, наконец, на уровне организма животного в целом. Кроме того, привлечены и теоретические расчеты. Такое построение работы характеризует диссертационное исследование, как выполненное **на высоком мировом уровне**.

Первая – большая и разносторонняя – группа результатов диссертации относится к доставке в нижние (дыхательные) отделы легких посредством интратрахеального введения. Сначала изучено биораспределение частиц ватерита трех разных размеров, от субмикронного до микронного, содержащих флуоресцентный агент: охарактеризованы сами частицы, включая оценку их стабильности в компонентах легочного сурфактанта *in*

vitro; описаны механизмы, влияющие на распределение таких частиц в легких; визуализировано распределение методом флуоресцентной томографии *in vivo*; исследованы криосрезы ткани респираторной части легкого и в дополнение получены данные о концентрации флуоресцентного вещества в крови. В результате такого детального исследования **сделан важный вывод** о том, что и субмикро-, и микрочастицы ватерита распределяются в легких после интратрахеального введения, демонстрируя более высокую интенсивность флуоресценции по сравнению со свободным флуорофором. При этом частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм обеспечивают наиболее эффективную и пролонгированную доставку флуорофора с визуализацией в альвеолярной области легких. В этой же части диссертации **впервые** синтезированы и охарактеризованы субмикрочастицы ватерита, содержащие бактериальную рибонуклеазу барназу (вещество, вызывающее апоптотическую гибель клетки), с функционализацией поверхности носителей адресным компонентом – олигонуклеотидом, специфичным к молекуле клеточной адгезии эпителия (ErCAM). Продемонстрированы 1) цитостатический эффект системы на клеточной линии легочной карциномы человека (A549); 2) отсутствие в результате введения частиц патологических изменений в альвеолярной структуре легочной ткани при гистологическом анализе; 3) более высокая флуоресценция метки в легких лабораторных животных через 1 ч после введения носителей с векторным фрагментом по сравнению с немодифицированными частицами (флуоресцентная визуализация органов *ex vivo*); 4) распространение разработанных носителей в альвеолах с повышением количества доставленных частиц при функционализации их поверхности вектором к ErCAM (анализ криосрезов легких). Вышеперечисленные результаты, представленные в главе 3 диссертации, могли бы служить материалом отдельной кандидатской диссертации, так как, несомненно, обладают **высоким уровнем новизны, оригинальности и значимости**. В этой части работы **впервые** продемонстрирована возможность использования частиц ватерита в качестве основы высокоэффективных систем доставки (в том числе адресной) терапевтических и диагностических агентов в дыхательные отделы легких путем интратрахеального введения и предложены механизмы функционирования таких систем.

Следующая часть результатов посвящена исследованию накопления субмикрочастиц ватерита, содержащих агент фотодинамической терапии рака, в солидной опухоли при внутривенном введении. **Впервые** проведена загрузка порфиразином и полная характеристика полученных контейнеров, продемонстрировано увеличение аккумуляции порфиразина в опухоли посредством использования частиц ватерита в качестве носителя и сохранение фотосенсибилизирующих свойств порфиразина при внутривенном введении лабораторным животным с привитыми подкожными опухолями. В этой части работы хочется отметить предложенный в диссертации механизм функционирования субмикрочастиц ватерита при доставке в опухоль, который автор позиционирует как **новую стратегию доставки**, альтернативную эффекту повышенной проницаемости и удержания (так называемому EPR-эффекту). Механизм заключается в прикреплении контейнеров из субмикрочастиц ватерита к стенкам сосудов опухоли, далее растворении/перекристаллизации частиц из-за низкой скорости кровотока в ядре опухоли, что сопровождается быстрым высвобождением загруженного вещества и соответственно возникновением его высокой локальной концентрации в сосуде, а затем в проникновении лекарства через стенки эндотелия в интерстиций опухоли за счет градиента концентрации.

В последней части диссертации описаны результаты по интрафолликулярной доставке противогрибкового препарата нафтифина. Так же как и для других исследуемых в работе систем, сначала получены и детально охарактеризованы контейнеры на основе частиц ватерита (в данном случае микронного размера). **Впервые** продемонстрированы возможность регулировки высвобождения нафтифина из микрочастиц ватерита посредством создания полиэлектролитной оболочки из полиаргинина, сульфата декстрана и гепарина; эффективный захват частиц дермальными фибробластами человека (NHDF) и пролонгированное противогрибковое действие новой композиции на культуре дрожжей линии *Candida albicans*, в 2 раза превышающее эффект свободного нафтифина. Показан механизм доставки лекарственного препарата в глубокие слои кожи, который заключается в проникновении контейнеров по всей глубине волосяного фолликула и растворении частиц ватерита в течение нескольких суток.

По диссертации имеются следующие **вопросы и замечания**:

- 1) В литературный обзор включены статьи, в которых изложены результаты представленного далее диссертационного исследования (стр. 37, ссылка 27; стр. 41, ссылка 23), что нарушает логику диссертации. В то же время описание антигрибковых свойств препарата нафтифина (стр. 152-153), его существующих лекарственных форм (стр. 155-156), а также различных способов лечения дерматомикозов (стр. 166-167) было бы уместнее включить не в описание результатов, а в литературный обзор.
- 2) В работе введение частиц в трахею осуществлялось в виде суспензии в физиологическом растворе (стр. 12 автореферата). Однако в рассуждениях о механизмах распространения частиц это не учитывается, создается впечатление, что микро- и субмикрочастицы поступают в легкие не в виде капель, а в виде сухого порошка с частицами соответствующего размера (стр. 11 и рис. 1Г автореферата или стр. 94-96 и рис. 27 диссертации).
- 3) Адсорбцию барназы на частицы ватерита проводили, используя раствор фермента в буфере ЭДТА (стр. 55), хотя известно, что ЭДТА является комплексоном к кальцию и хорошо растворяет CaCO_3 . При этом концентрация ЭДТА мала, всего 0.01 мМ, но этого достаточно, чтобы частично растворить материал ядра.
- 4) В работе продемонстрировано, что для порфиразина при использовании субмикрочастиц ватерита в качестве носителя повышается время жизни флуоресценции; при внутривенном введении системы «порфиразин-ватерит» лабораторным животным наблюдается флуоресцентный контраст опухоли по сравнению со здоровыми тканями в отличие от введения свободного порфиразина. Также сделан вывод о почти в 2 раза большем накоплении агента в опухоли при использовании носителя по сравнению со свободным веществом. Как тогда можно объяснить результаты фотодинамической терапии, которые свидетельствуют о сопоставимом эффекте или даже чуть худшем для системы «порфиразин-ватерит»?
- 5) Спектры комбинационного рассеяния противогрибкового препарата нафтифина существенно отличаются до и после включения в частицы ватерита (рис. 58). Чем вызваны наблюдающиеся изменения? Было бы уместно привести в диссертации формулу соединения. Сохраняются ли изменения молекулярной структуры после высвобождения нафтифина из частиц?

Перечисленные замечания не снижают общей **высокой оценки** диссертации. Несомненно, проделана огромная работа, получено большое количество результатов

мирового уровня по значимости, как теоретической (механизмы функционирования контейнеров доставки при различных способах введения), так и практической (создание эффективных контейнеров доставки, в том числе адресной, загруженных потенциальными терапевтическими агентами, что может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов). Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, **полностью обоснованы. Высокий уровень** работы демонстрируют публикации в высокорейтинговых международных журналах. **Достоверность** полученных результатов подтверждена, помимо этого, апробацией на 7 российских и международных конференциях по теме диссертации, а также соответствием данным, имеющимся в научной литературе. Автореферат дает полное представление о содержании диссертации.

Объем работы и уровень ее значимости, актуальность поставленных и решенных задач свидетельствуют о том, что диссертация Гуслияковой О.И. является законченным научным исследованием. Результаты, представленные в диссертационной работе, вносят существенный вклад в биофизические аспекты изучения биораспределения и деградации носителей терапевтических и диагностических агентов при различных способах их введения в организм. Диссертационная работа Гуслияковой О.И. «Биораспределение и деградация микронных и субмикронных частиц ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения» соответствует требованиям п. 9-11, 13, 14, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, согласно Положению о присуждении ученых степеней, утвержденному постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 №842. Автор диссертационной работы Гуслиякова О.И. заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Официальный оппонент

Букреева Татьяна Владимировна

доктор химических наук

(специальность 02.00.11 – коллоидная химия),

доцент, ведущий научный сотрудник

лаборатории биоорганических структур

Института кристаллографии им. А.В. Шубникова

Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники (КККиФ)

Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

02.12.2024

Адрес места работы: 119333, г. Москва, Ленинский проспект, д. 59, КККиФ

E-mail: bukreeva@crys.gas.ru, тел. +7(499)135-40-20

Подпись Т.В. Букреевой заверяю

Главный ученый секретарь
НИЦ «Курчатовский институт»



О.А. Алексеева