

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.392.06, СОЗДАННОГО НА
БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО», ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25.12.2024 № 107/24

О присуждении **Гусляковой Ольге Игоревне**, гражданке РФ, учёной степени кандидата физико-математических наук.

Диссертация «Биораспределение и деградация микронных и субмикронных частиц ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения» по специальности 1.5.2. - Биофизика принята к защите 7 октября 2024 года, протокол № 100/24, диссертационным советом 24.2.392.06, созданным на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского», г. Саратов, ул. Астраханская, 83. Совет 24.2.392.06 создан приказом Минобрнауки России № 362/нк от 19.03.2020 г.

Соискатель, Гуслякова Ольга Игоревна, гражданка РФ, 17.12.1987 года рождения, в 2010 году окончила государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по направлению подготовки 03.04.03 «Радиофизика» с присуждением степени «Магистр Радиофизики». В 2020 году Гуслякова Ольга Игоревна закончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по направлению подготовки в аспирантуре 03.06.01 Физика и астрономия, направленность Биофизика, с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь». Гуслякова Ольга Игоревна была прикреплена для написания диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности «Биофизика» с 01 ноября 2022 года сроком на 3 года (до 01 ноября 2025 года) согласно приказу № 147-Д от 26.10.2022 г.

Диссертация выполнена в лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель: Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор по специальности биофизика, профессор автономной некоммерческой

образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Официальные оппоненты,

Хомутов Геннадий Борисович, доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры биофизики физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», (г. Москва) и

Букреева Татьяна Владимировна, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоорганических структур Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (ИТМО), г. Санкт-Петербург, в своём положительном заключении, подписанном профессором международного научно-образовательного Центра физики наноструктур, руководителем международной лаборатории «Гибридные наноструктуры для биомедицины», доктором физико-математических наук, профессором Орловой Анной Олеговной и утвержденном ректором ИТМО, доктором технических наук, профессором, член-корреспондентом РАН Васильевым Владимиром Николаевичем, отметила актуальность проведенного исследования, новизну полученных результатов, а также теоретическую и практическую значимость работы, высокий научный уровень диссертации, и указала, что диссертация Гусляковой Ольги Игоревны «Биораспределение и деградация микронных и субмикронных частиц ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения» удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Гуслякова Ольга Игоревна заслуживает присуждения степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высоким уровнем экспертизы и близким соответствием проводимых ими исследований теме диссертации, высокой квалификацией в области изучения закономерностей биораспределения и взаимодействия живых систем и систем доставки лекарственных средств различной природы.

Соискатель имеет 12 опубликованных научных работ по теме диссертации, в их числе 5 статей в изданиях, входящих в перечень ВАК или индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Наиболее значимые публикации автора по теме диссертации:

1. **Gusliakova, O.**, Atochina-Vasserman, E. N., Sindeeva, O., Sindeev, S., Pinyaev, S., Pyataev, N., Revin, V., Sukhorukov, G.B., Gorin, D., Gow, A. J. Use of submicron vaterite particles serves as an effective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – Т. 9. – С. 559. DOI: 10.3389/fphar.2018.00559 (Q1, IF 4.4)

В работе исследовано биораспределение частиц ватерита при интратрахеальном введении с помощью флуоресцентной томографии и микроскопии. Определена взаимосвязь между глубиной проникновения частиц в легкие и их размером. Частицы субмикронного размера достигали альвеолярной части легких и обеспечивали длительную аккумуляцию флуоресцентного агента в легких. Исследовано влияние компонент бронхоальвеолярного лаважа на скорость частиц перехода из ватеритной фазы в кальцитную. Обнаружено значительное замедление трансформации в кальцит.

2. Abakumova T. O., **Gusliakova O. I.**, Cvjetinovic, J., Efimova, O. I., Konovalova, E. V., Schulga, A. A., Zatsepin, T. S., Gorin, D. A., Yashchenok, A. M., Deyev, S. M. Barnase-Loaded Vaterite Nanoparticles Functionalized by EpCAM Targeting Vectors for the Treatment of Lung Diseases // *ACS Applied Nano Materials*. – 2022. – Т. 5. – №. 8. – С. 10744-10754., DOI: 10.1021/acsanm.2c02078 (Q1, IF 5.4)

В работе показана методика создания терапевтической композиции на основе субмикронных частиц ватерита покрытых оболочкой, содержащей рибонуклеазу барназу, и дополнительной модификацией аптамером специфичным к EpCAM. Было продемонстрировано, что конъюгация частиц с направляющим вектором резко увеличивает интернализацию частиц в клетках аденокарциномы легких человека и приводит к значительному цитотоксическому эффекту. Анализ биораспределения *in vivo* показал, что интратрахеальное введение таких частиц вызывает лучшее накопление частиц в легочных тканях, что было выявлено с помощью флуоресцентной томографии и конфокальной микроскопии.

3. Parakhonskiy B. V., Shilyagina N. Y., **Gusliakova O.I.**, Volovetskiy A.B., Kostyuk A.B., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Lermontova S. A., Tolmachev V., Orlova A., Gorin D.A., Sukhorukov G.B., Zvyagin A.V. A method of drug delivery to tumors based on rapidly biodegradable drug-loaded containers // *Applied Materials Today*. – 2021. – Т. 25. – С. 101199., DOI: 10.1016/j.apmt.2021.101199 (Q1, IF 8.3)

Была представлена новая концепция доставки лекарств, которая основана на пассивном накоплении контейнера с лекарством в сосудистой системе опухоли с последующим высвобождением малых молекул в течение нескольких часов, которые проникают через стенки капилляров в интерстиций, а затем и в паранхиму опухоли. Чтобы продемонстрировать такой подход, коллоидный раствор субмикронных частиц ватерита, загруженных фотосенсибилизатором порфиразином, вводили внутривенно мышам с подкожно перевитой аденокарциномой кишечника и проводили визуализацию

биораспределения порфиразина в опухолях *in vivo*. Поглощение опухолью порфиразина было увеличено примерно 1.8 раза при инкапсуляции в частицы ватерита. Была продемонстрирована успешная фотодинамическая терапия.

На **автореферат** диссертации поступило **4** положительных **отзыва**. В них отмечены актуальность, высокий уровень работы, научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Отзывы поступили от:

- 1) Синдеевой Ольги Александровны, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Сколковского института науки и технологий;

Вопросы:

- Соискатель пишет о том, что белки и молекулы, с которыми частицы ватерита вступают во взаимодействие в организме, стабилизируют этот тип контейнера, уменьшая скорость деградации и снижая скорость высвобождения лекарства. Как соискатель считает, оказывает ли аналогичное влияние сами инкапсулированные молекулы активных веществ, описанные в данной работе? Есть ли какая-то достоверная разница между типами загружаемых в ватериты веществ?
- Хотелось бы также услышать мнение соискателя о том, какой из рассмотренных типов доставки в организм автор считает наиболее перспективным для ватерита, и для каких нозологий он предложил бы использовать такую комбинацию адресной доставки лекарств?

- 2) Воденеева Владимира Анатольевича, доктора биологических наук, доцента, заведующего кафедрой биофизики Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского и Шилягиной Натальи Юрьевны, кандидата биологических наук, доцента, доцента кафедрой биофизики Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского; замечаний нет;
- 3) Ермакова Алексея Вадимовича, кандидата физико-математических наук, старшего научного сотрудника Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского Минздрава России;

Вопросы и замечания:

- С чем автор связывает не столько яркий противоопухолевый эффект при ФДТ с введением порфиразина в составе частиц ватерита по сравнению с использованием свободного вещества?
- В тексте содержится ряд опечаток и орфографических ошибок.

- 4) Евстигнеевой Стеллы Сергеевны, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов ФИЦ «СНЦ РАН»;

Замечания:

- На странице 19 присутствует отсылка к *таблице 1*, однако, сама таблица в тексте автореферата отсутствует. Для более подробного ознакомления с данными нужно будет искать информацию в тексте диссертации, что не совсем удобно.
- На *рисунке 1* и *4* некоторые подписи не переведены на русский язык.
- В подрисуночной подписи к *рисунку 2* указаны буквенные обозначения (А), (Б), и (В), тем не менее, на самом рисунке они отсутствуют.
- Не указан штамм используемого в работе вида дрожжеподобных грибов *Candida albicans*.

На все высказанные замечания соискателем даны исчерпывающие ответы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

1. Показана возможность пассивной адресации частиц ватерита субмикронного размера (0.65 ± 0.17 мкм) в альвеолы легких мыши после интратрахеального введения, в большей степени управляемой процессом диффузии при движении таких частиц в потоке. По оценке, частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм обладали наименьшим числом Стокса по сравнению с другими рассмотренными размерами частиц ватерита.
2. Показано влияние дополнительной функционализации поверхности структур «ядро-оболочка» на основе субмикронных частиц ватерита и оболочки, содержащей фермент барназа, аптамером к ЕрСАМ на удержание в целевом органе (легких) после интратрахеальной инстилляцией за счет лиганд-рецепторного взаимодействия.
3. Показано значительное замедление процесса диссоциации и перекристаллизации частиц ватерита субмикронного размера при инкубировании с разными фракциями бронхоальвеолярного лаважа мыши *in vitro* в следствии связывания компонент легочного флюида с поверхностью частиц и препятствования покиданию ионов Ca^{2+} .
4. Представлена концепция объясняющая большее накопление агента фотодинамической терапии порфиразина в подкожно перевитом опухолевом узле в случае внутривенного введения в составе частиц ватерита по сравнению с введением свободного препарата. Концепция основана на быстром накоплении в опухоли вводимых частиц ватерита, содержащих порфиразин, вследствие адгезии к эндотелию кровеносных сосудов в силу аномалий сосудистой сети, характеризующихся медленной скоростью кровотока и

извилистой архитектурой, и последующего быстрого высвобождения лекарственного средства в условиях слабокислой среды микроокружения. Локально высокая концентрация терапевтического вещества способствует его распространению из капилляра в интерстиций и паренхиму опухоли.

5. Представлена математическая модель, описывающая изменение концентрации низкомолекулярного вещества порфиразин в зависимости от времени и расстояния от сосуда до точки рассмотрения, расположенной в паренхиме опухоли. Проведенное численное моделирование зависимости создаваемой концентрации порфиразина в паренхиме опухоли на фиксированном расстоянии от капилляра ($r = 50$ мкм) от времени показало преимущество быстро высвобождающих частиц ватерита по сравнению с медленно высвобождающими частицами на основе сополимера молочной и гликолиевой кислот.
6. Проведено сравнительное изучение антимикотических свойств частиц ватерита, содержащих противогрибковый препарат нафтифин, и его свободной формы и подтверждена большая эффективность ингибирования роста дрожжеподобных грибов рода *C.albicans* в случае использования инкапсулированной в частицы ватерита лекарственной формы за счет эффекта длительного высвобождения.
7. Продемонстрировано проникновение и длительная деградация частиц ватерита, содержащих нафтифин, по всей длине волосяного фолликула мыши после нанесения суспензии частиц на кожу и внедрения опосредованного применением терапевтического ультразвука (с частотой 1 МГц, мощностью 0.5 Вт/см², длительностью воздействия 3 минуты).

Теоретическая значимость работы обусловлена важностью полученных результатов для понимания закономерностей биораспределения частиц ватерита при различных способах введения (интратрахеальном, внутривенном и трансфолликулярном), их преимуществ для использования в качестве системы доставки лекарственных средств с позиции биофизических процессов, протекающих в здоровых и патологических тканях и органах. Определены методики, обеспечивающие эффективную локализацию носителей на основе частиц ватерита в целевых органах.

Полученные результаты имеют **практическую значимость**, поскольку подтверждают тот факт, что субмикронные пористые частицы ватерита способны обеспечить значимые преимущества при выборе тактик лечения различных заболеваний. С позиций терапии легочных заболеваний, таких как хроническая обструктивная болезнь легких и острое поражение легких, критически важным является адресация в альвеолярную часть легких, что

может быть достигнуто с помощью интратрахеального введения субмикронных частиц ватерита. Кроме того, взаимодействие с компонентами легочного сурфактанта будет вызывать медленное высвобождение лекарства, что может быть полезно при лечении хронических заболеваний легких, таких как эмфизема. Лекарственная форма, включающая частицы ватерита в качестве ядра и фермент барназа в качестве оболочки, модифицированная направляющим вектором может быть эффективной при лечении раковых заболеваний и вирусных инфекций, включая коронавирусные заболевания человека. Результаты исследования накопления частиц ватерита в опухолях после внутривенного введения и последующего быстрого высвобождения лекарственного средства (порфиразина) могут быть применены для улучшения тактик терапии онкологических заболеваний с использованием высокотоксичных препаратов. Такие формы способны обеспечить в опухоли локально высокую концентрацию иммобилизованного лекарственного средства.

Достоверность результатов, выводов, обсуждений и заключений, представленных в диссертационном исследовании, обеспечивается следующими факторами:

1. Использованием современного научного оборудования и программного обеспечения, а также апробированных методик расчета.
2. Достаточным объемом материала, задействованного в исследовании.
3. Применением хорошо зарекомендовавших себя статистических методов обработки данных.
4. Воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их соответствием, где это возможно, результатам других авторов.
5. Публикацией результатов в рецензируемых научных журналах как в России, так и за рубежом.

Личный вклад соискателя: автор самостоятельно выполнил представленные в диссертации экспериментальные исследования и расчеты, провел синтез, визуализацию и характеризацию исследуемых носителей, определение эффективности загрузки и высвобождения из ватеритных контейнеров модельных и терапевтических веществ, визуализацию как отдельных биологических тканей методами лазерной сканирующей конфокальной и сканирующей электронной микроскопии, так и всего организма в целом методами флуоресцентной томографии. Постановка задач и интерпретация результатов осуществлялись совместно с научным руководителем.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания и вопросы:

1. Какой размер пор у используемых Вами частиц ватерит? Влияет ли размер инкапсулируемой молекулы на скорость высвобождения? Изучали ли Вы механизмы удержания инкапсулированных молекул в структуре веществ?

2. Определяли ли максимальную загрузку веществ в представленные частицы?
3. На 20 слайде в формуле описывающей изменение концентрации присутствует функция $\phi(t')$. Поясните что означает эта функция?
4. В работе используются частицы размером 0.65 и 0.47 мкм. Есть ли разница в применение таких частиц?
5. Какие методы оценки концентраций высвобождающихся веществ, как флуоресцентных, так и не флуоресцентных, были использованы в представленном исследовании? Линейный ли вид имела калибровочная кривая?
6. Исследовалась ли агрегация частиц? Исследовалась ли зависимость в агрегации частиц при изменении размера? Является ли агрегация негативным фактором и боролись ли Вы с ней?
7. Формулы, описывающие распределение частиц в легких, были получены Вами или взяты из литературы? Какие приближения были сделаны при получении этих формул?
8. В случае наружного нанесения частиц, в какой жидкости была произведена аппликация? Использовали ДМСО для наружного нанесения? Проникновение Вы улучшали с помощью ультразвука?

Соискатель Гусякова Ольга Игоревна ответила на заданные ей вопросы, и привела собственную аргументацию:

1. По литературным данным размер пор частиц ватерита составляет десятки нанометров. На скорость высвобождения молекул из состава частиц ватерита влияет размер инкапсулируемых веществ. Низкомолекулярные вещества высвобождаются быстрее, высокомолекулярные вещества дольше держаться в структуре частиц ватерита. Вопросы, объясняющие механизм удержания веществ в структуре частиц ватерита в диссертационной работе не приведены, однако имеются экспериментальные данные, показывающие, что эффективность удержания инкапсулированных молекул в структуре частиц ватерита варьируется от вещества к веществу.
2. Была проведена оценка эффективности загрузки для высокомолекулярного вещества, а именно конъюгат альбумина и флуоресцентного красителя Цианин 7. Для частиц с самым наименьшим размером данный параметр достиг значения в 10% по массе, что по литературным данным можно принять за максимальное значение.
3. Данная функция была получена аппроксимацией экспериментальных данных высвобождения из частиц ватерита в среде с рН 6.8. Аппроксимация была выполнена с использованием модели Вейбулла.
4. Частицы ватерита субмикронного размера были получены в ходе синтезов с одинаковым протоколом, подразумевающим смешение солей в присутствии вещества

повышающего вязкость реакционной смеси, вследствие чего происходит замедление роста кристаллов. Однако, итоговое распределение по размерам полученных частиц варьировалось от синтеза к синтезу. Различие на итоговом биораспределении вводимых частиц с размером 0.65 и 0.47 мкм будет не столь значимое, как в случае сравнения биораспределения частиц 3 и 0.5 мкм. Поэтому разницей в 200 мкм в рамках представленного исследования можно было пренебречь.

5. Во всех случаях был использован спектрофотометрический способ оценки концентрации веществ в растворах. Предварительно были получены калибровочные прямые, построенные по измерению растворов с известными концентрациями. В соответствии с полученным уравнением калибровочной кривой были произведены расчеты концентраций высвобождающихся веществ. Калибровка имела линейный вид.
6. Различия в агрегационной способности частиц различного диаметра не были исследованы в представленной работе. В части, посвященной доставке частиц в сосуды опухоли агрегация была рассмотрена как положительное явление. Вследствие аномального, извилистого строения сосудов опухоли и снижения скорости кровотока, частицы попадающие в сосуды опухоли имеют тенденцию прилипать и скапливаться на стенках сосудов, тем самым формируя депо, которое будет высвобождать инкапсулированное вещество. Сформированный агрегат частиц ватерита будет растворяться под действием слабокислого pH, создавая локально высокую концентрацию вещества (в данном исследовании – это порфиразин), которое будет стремиться проникнуть в интерстиций и паренхиму опухоли по градиенту концентраций. Таким образом, в данном исследовании агрегация частиц может быть рассмотрена как положительное явление.
7. Формулы, описывающие распределение частиц в легких, были взяты из литературы, ссылка на статью представлена внизу слайда. В данном случае был рассмотрен ламинарный поток.
8. В 70% растворе спирта, для уменьшения липидного слоя и улучшения проникновения частиц. ДМСО в представленном исследовании не был использован, однако из литературных данных можно сказать, что его также используют для снижения липидного и улучшения проникновения внедряемых веществ. После нанесения на кожу был использован терапевтический ультразвук для улучшения проникновения.

В результате рассмотрения диссертации Гусяковой Ольги Игоревны «Биораспределение и деградация микронных и субмикронных частиц ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения» на заседании 25 декабря 2024 года диссертационный совет принял решение присудить Гусяковой Ольге

Игоревне учёную степень кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. – Биофизика за достижения в области исследования биофизических закономерностей распределения и деградации частиц ватерита при интратрахеальном, внутривенном и местном введении.

При проведении тайного электронного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 5 человека, участвующих в интерактивном режиме, 10 докторов наук по специальности 1.5.2. – Биофизика, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали за – 15, против – нет, воздержались – нет.

Заключение составил

Член диссертационного совета

д.х.н., проф.

Горячева Ирина Юрьевна

Председатель диссертационного совета,

д.ф.-м.н., проф., чл.-корр. РАН



Тучин Валерий Викторович

Учёный секретарь диссертационного совета

д.ф.-м.н., профессор

25.12.2024

Генина Элина Алексеевна