

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Колевой Ларисы на тему: «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

1.5.2 биофизика

Актуальность диссертационной работы

Одной из важнейших задач фармакологии является поиск новых лекарственных форм препаратов, которые обеспечивали бы лучшую эффективность, пролонгированность действия и снижение отрицательных побочных эффектов лекарственных средств, улучшали бы их безопасность. Примером таких полупродуктов для последующего создания на их основе лекарственных форм являются эритроциты. Использование эритроцитов в качестве носителей лекарственных веществ остается актуальной задачей в научном сообществе на протяжении вот уже более 40 лет. Об этом свидетельствуют многочисленные обзоры, посвященные данной теме, которые периодически собирают все новые и новые знания о возможностях создания и внедрения в повседневную клиническую практику подобных лекарственных препаратов.

Об актуальности, перспективах и практической значимости создания эритроцитов-носителей говорит также наличие клинических исследований по этой теме. Так, включение препаратов внутрь эритроцитов и введение таким образом в организм позволяет снизить кардиотоксичность антрациклиновых антибиотиков, противоопухолевых алкалоидов, иммунный ответ на β -аспарагиназу, увеличить время циркуляции и обеспечить биотрансформацию пролекарств для дальнейшего получения в клетке и постепенного высвобождения в кровоток гормонов и противовирусных препаратов.

Преимущества включения лекарственных веществ в эритроциты давно известны и во многом связаны с физиологическими особенностями этих клеток.

Одним из перспективных направлений применения эритроцитов-биореакторов (ЭБР), способных удалять из плазмы некоторые низкомолекулярные метаболиты. Актуальным можно считать задачи удаления аммония из крови больных в состоянии гипераммониемии, развивающимся при острых и хронических заболеваниях печени, при болезнях, связанных с нарушением цикла выведения мочевины, а также

удаление из плазмы аспарагина – необходимого компонента развития опухолевых клеток. Такое состояние требует обязательной и быстрой коррекции, однако, к сожалению, существующие лекарственные средства снижают уровень аммония в крови достаточно медленно. Использование эритроцитов, перерабатывающих аммоний, является перспективным для быстрого снижения концентрации аммония в крови у пациентов, для которых существующие методы лечения гипераммониемии недостаточно эффективны. Несмотря на эффективность аспарагиназы как противоопухолевого препарата, его применение осложнено многими побочными эффектами.

Таким образом, разработка ЭБР, способных удалять их кровотока аспарагин или аммоний, которые можно было бы применять в клинической практике, является актуальной задачей.

Структура диссертации

Работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, главы собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы.

Во Введении описана актуальность исследованной темы, цели и задачи исследования и дана общая характеристика работы.

Глава 1 содержит обзор литературы, который включает описание строения, метаболизма и регуляции объема эритроцитов, описание гипоосмотических методов включения в эритроциты биологически активных веществ, а также функций, которые могут осуществлять эритроциты-носители лекарств (фармакоциты) в организме. Изложены сведения об использовании аспарагиназы в противоопухолевой терапии, а также описаны предыдущие попытки создать ЭБР для убирания из кровотока аспарагина или избыточного аммония.

Глава 2 описывает материалы и методы, использованные при выполнении работы.

Глава 3 посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

В заключении диссертационной работы описаны кратко результаты по разработке новых систем доставки на основе эритроцитов в качестве носителей лекарственных веществ. Сформулированы общие выводы по результатам диссертационного исследования.

Практическая значимость результатов, их достоверность и новизна

В диссертационной работе Колевой Ларисы впервые создана отечественная форма доставки аспарагиназы по средствам включения в эритроциты в стерильных условиях, которая может быть использована в клинике после проведения полноценных клинических испытаний.

Автором разработано устройство, позволяющее методом проточного гипоосмотического диализа в автоматическом режиме эффективно инкапсулировать ферментные лекарственные препараты, в том числе аспарагиназу, в эритроциты, которое было запатентовано, и для которого были подобраны оптимальные условия проведения различных стадий процесса.

Впервые продемонстрирована возможность увеличения эффективности загрузки в эритроциты глутаматдегидрогеназы (ГДГ) благодаря применению высокоэффективного метода проточного диализа включения ферментов в эритроциты и использованию ГДГ бактериального происхождения. Это в перспективе создаст возможность получения аммоцитов, которые можно будет использовать в клинической практике для терапии гипераммониемии. Все выбранные оптимальные величины отдельных параметров процесса были далее применены при создании автоматической установки для получения фармакоцитов.

Автором впервые показано, что наиболее эффективным для получения эритроцитов с включенной аспарагиназой является метод проточного гипоосмотического диализа на основе систематического сравнения различных гипоосмотических методов. Разработана и запатентована полностью автоматическая установка для стерильного получения ЭБР с аспарагиназой или другими лекарственными препаратами. Установлена стабильность ЭБР с аспарагиназой в процессе их хранения в течение 14 дней при 4°C. В первичных скрининговых исследованиях показана безопасность применения отечественных ЭБР с аспарагиназой в клинической практике у 2-х пациентов с острым лимфобластным лейкозом.

В работе впервые получены аммоциты, способные утилизировать аммоний *in vitro*, содержащие совместно включенные ГДГ из *Proteus sp.* и аланинаминотрансферазу из сердца свиньи. Впервые для оценки качества полученных эритроцитов-биореакторов был использован метод измерения фильтруемости эритроцитов, характеризующий их способность деформироваться.

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием общепринятых современных методов анализа (спектрофотометрия, флуориметрия, статистические методы обработки результатов) и подтверждаются согласованностью всех полученных экспериментальных материалов как между собой, так и с ранее опубликованными в литературе данными.

Публикации по теме диссертации

По результатам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих требованиям ВАК. Материалы работы также опубликованы в трудах конференций (6 тезисов докладов), получен 1 патент.

Вопросы и замечания

В целом работа Колевой Ларисы изложена на высоком научном уровне. Однако, ряд ее положений вызывает вопросы и замечания:

1. В работе встречаются отдельные опечатки, неудачные фразы и стилистические неточности.
2. Строго говоря, в работе встречается вольное использование фармацевтической терминологии, такой как «лекарственная форма» и «лекарственный препарат». Полученные эритроциты-биореакторы не могут называться лекарственными формами и лекарственными препаратами. Это скорее полупродукты для дальнейшего получения лекарственных форм.
3. Список литературы оформлен не в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.100–2018. БИБЛИОГРАФИЧЕСКАЯ ЗАПИСЬ.
4. Выборка для проведения «клинических испытаний», как указывает автор, слишком мала. Исследования на 2-х пациентах нельзя считать репрезентативными для однозначного утверждения о безопасности полученных фармакоцитов с L-аспарагиназой. Скорее речь идет о первичных скрининговых исследованиях.
5. Как предполагается (есть ли возможность, по мнению автора) получения лекарственных форм на основе разработанных эритроцитов-биореакторов (например, лиофилизатов суспензий ЭБР) в промышленных масштабах?
6. Во сколько раз увеличивается время жизни в кровотоке аспарагиназы, включенной в ЭБР, по сравнению со свободным ферментом? Во сколько раз возрастает эффективность совместного инкапсулирования ГДГ и АЛТ в

эритроциты при использовании предложенного способа по сравнению с описанным в литературе?

7. Не использовали ли вы в своей работе среды, модифицированные различными ПЭГами (400 или 4000), АТФ или диметилсульфоксидом, для увеличения эффективности включения исследуемых ферментных препаратов в эритроциты?

8. Почему при проведении исследования фармакокинетики и фармакодинамики полученных ЭБР с L-аспарагиназой, доза фермента на кг массы тела была различна (90 МЕ/кг в 1 случае и 189 МЕ/кг во 2-ом случае)? Какова максимально возможная доза препарата на кг массы тела может быть введена таким образом?

9. Почему оценке не подвергались и другие параметры, характеризующие эритроциты после включения в них ферментов (морфология инкапсулированных эритроцитов, агрегационная способность, турбулентная хрупкость, физико-химические параметры ЭБР)? Может ли показатель фильтрации их заменить?

10. В работе показано, что срок хранения ЭБР с аспарагиназой не превышает 14 дней при 4°C. Не думали ли вы над возможностью получения ЭБР с изученными ферментами с длительным сроком хранения путем замораживания в глубоком вакууме, которые можно было во флаконах с прилагаемым растворителем для получения растворов ex tempore, хранить и транспортировать? И таким образом масштабировать производство подобных фармакоцитов из донорской крови.

Тем не менее, указанные замечания не снижают общей положительной оценки работы, а вопросы носят уточняющий характер.

Заключение

По совокупности использованных методов, уровню поставленных задач и научной значимости полученных результатов работа Колевой Ларисы в целом, представляет собой законченное исследование достаточно высокого уровня, которое выполнено на актуальную тему. Работа характеризуется достаточной новизной и практической значимостью и направлена на решение важной задачи фармацевтической отрасли по созданию эффективных и безопасных лекарственных препаратов на основе эритроцитов-биореакторов для удаления из кровотока низкомолекулярных метаболитов (для лечения некоторых онкологических заболеваний и гипергаммониемии). Получены весомые научные результаты, которые

прошли апробацию на российских и международных конференциях и достаточно полно отражены в публикациях в рецензируемых изданиях.

Диссертационная работа Колевой Ларисы на тему «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» полностью отвечает требованиям, предъявляемым к научным диссертациям согласно положению «Положение о присуждении ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 в действующей редакции от 18 марта 2023 г., а ее автор, Колева Лариса, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент,
доктор фармацевтических наук
(14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия), доцент,
профессор кафедры фармацевтической химии и
фармацевтической технологии фармацевтического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Воронежский государственный университет»

Министерства науки и
высшего образования РФ

Тринеева Ольга Валерьевна

Адрес: 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл. 1

Контактный телефон: +7-473-255-47-76

Электронный адрес: trineevaov@mail.ru

Подпись Тринеевой Ольги Валерьевны заверяю

Ученый секретарь ФГБОУ ВО

«Воронежский государственный университет»

Лопатова М.А.

21 апреля 2023 года

