ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора фармацевтических наук, Потаниной Ольги Георгиевной на диссертационную работу **Турецкого Евгения Александровича** ***«Создание стандартного образца водного раствора фуллерена»,*** представленную в Диссертационный совет ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Актуальность темы исследования

Фуллерены, как класс соединений, были открыты более тридцати лет назад. К настоящему времени проведены многочисленные исследования физико-химических свойств и биологической активности этих соединений, наиболее изученным в этом отношении является фуллерен С60. Экспериментально была показана противовоспалительная, противовирусная, антиоксидантная и цитопротекторная активность этого соединения.

Однако, несмотря на объем накопленной информации о свойствах и биологической активности фуллерена С60, вопрос о возможности применения этого соединения в медицинской практике в качестве лекарственного средства пока не решен.

Причина этого заключается с одной стороны, в отсутствии разработанных рекомендаций для доклинического и клинического изучения препаратов, представляющих собой наночастицы, а с другой – во множестве нетривиальных задач, которые необходимо решить при разработке способа получения, стандартизации и контроле качества таких препаратов, а также и проведении фармакокинетических исследований.

Исследования последних лет показали, что биологическая активность фуллеренов в значительной степени зависит от их физико-химических свойств (растворимости в воде и водных средах, размера и характера частиц), а также наличия примесей, имеющих собственную биологическую активность (например, органических растворителей, используемых в процессе производства). Различия в этих характеристиках могут кардинальным образом влиять на результаты биологических экспериментов, и этот факт явился причиной противоречивости экспериментальных данных, полученных в более ранних исследованиях.

Таким образом, для ответа на вопрос о возможности создания

лекарственного средства на основе фуллеренов необходимо проведение дальнейших исследований, в задачи которых входила бы разработка технологии получения наночастиц фуллерена, пригодных для создания лекарственных препаратов, а также разработка комплекса методик их стандартизации и контроля качества.

Настоящая диссертационная работа содержит результаты исследований по разработке способа получения водной дисперсии (так называемого, водного раствора) фуллерена С60, а также по созданию стандартного образца для использования в контроле качества лекарственных средств на ее основе.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения диссертационной работы Турецкого Евгения Александровича основаны на результатах проведенных экспериментов с использованием современных физико-химических методов анализа

Научные выводы и рекомендации основаны на достаточном объеме экспериментального материала, являются непротиворечивыми и логически вытекают из результатов исследования.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов

Новизна проведенных исследований заключается в том, что автором был разработан новый, оригинальный, способ получения водного раствора фуллерена С60 с применением ультрафильтрации, позволяющий значительно повысить концентрацию фуллерена в растворе по сравнению с другими, ранее разработанными способами. Разработанный способ защищен патентом Российской Федерации.

Впервые изучено влияние неионогенных поверхностно-активных веществ на процесс ультрафильтрации и структурные особенности наночастиц фуллерена в растворе. Показано увеличение седиментационной и агрегационной устойчивости дисперсий, сопровождаемое увеличением размера частиц в дисперсиях.

Впервые изучены физико-химические и спектральные характеристики водного раствора фуллерена, полученного методом ультрафильтрации с применением методов ИК-, УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии, динамического светорассеяния.

Исследованы токсические свойства водного раствора фуллерена, полученного методом ультрафильтрации, in vitro, на клеточных культурах, и

in vivo, на мышах линии BALB/c при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 30 дней. Показано отсутствие цитотоксического эффекта водного раствора фуллерена, а также отсутствие патологических изменений в органах и тканях лабораторных животных.

Достоверность полученных результатов подтверждается представленными в тексте диссертации первичными данными, результатами их статистической обработки, а также результатами арбитражных методов анализа. Экспериментальные данные получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную проверку и зарегистрированного в Реестре средств измерения.

Основные результаты диссертационной работы апробированы на международных научно-практических конференциях.

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 1 патент РФ, 1 статья в зарубежном рецензируемом журнале, входящем в международные базы данных (Scopus) и 1 статья – в рецензируемом журнале, рекомендуемом ВАК РФ.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе объекта и направления исследований, проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задач до их практической реализации, включая обсуждение результатов в научных публикациях, докладах, а также их внедрение в практику.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Значимость проведенных исследований заключается в разработке нового способа получения водного раствора фуллерена, позволяющего повысить концентрацию фуллерена в растворе и обеспечивающего высокую агрегативную и седиментационную устойчивость полученных растворов, в том числе и в растворах солей (буферных растворах и физрастворе).

Также автором диссертационного исследования были разработаны методики контроля качества полученного новым способом водного раствора фуллерена, включая методику контроля специфического показателя – размера частиц методом динамического светорассеяния. С применением этих

методик разработан стандартный образец фуллерена С60, который может использоваться в контроле качества препаратов на основе фуллерена С60.

Структура и содержание диссертации

Представленная диссертационная работа изложена на 100 страницах машинописного текста, построена традиционно и состоит из ведения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (2 главы), общих выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 35 рисунками и 3 таблицами. Список литературы включает 112 источников, из них 112 на английском языке.

Во введении обоснована актуальность темы, представлена информация о степени разработанности темы исследования, определены цель и задачи исследования, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов исследования, определены основные положения, выносимые на защиту, методология и методы исследования, приведена информация о степени достоверности и апробации результатов исследования, личном вкладе автора, внедрении результатов исследования, соответствии диссертации паспорту научной специальности, количестве публикаций.

В первой главе (обзор литературы) автором подробно рассматривается биологическая активность фуллеренов в контексте актуальности внедрения лекарственных препаратов на их основе в медицинскую практику. Отдельное внимание уделено обзору публикаций, касающихся токсичности фуллеренов, а также способам получения водорастворимых форм фуллерена, а также основным подходам к их стандартизации.

По результатам проведенного обзора сделан вывод о перспективности разработки лекарственных препаратов на основе водной дисперсии фуллерена C_{60}, а также о возможности использования спектральных методов в анализе водных дисперсий фуллерена.

Вторая глава содержит описание методов и методик, использованных при получении и контроле качества водного раствора фуллерена С60.

В третьей главе представлены результаты разработки способа получения водного раствора фуллерена С60 и методик контроля ее качества.

Представлены результаты по выбору времени растворения фуллерена в 1-метил-2-пирролидоне, способ и методика фильтрации при получении водного раствора, обоснован выбор мембран для проведения ультрафильтрации, а также выбор стабилизатора, обеспечивающего

минимальный размер частиц дисперсии и оптимальную величину ζ-потенциала.

Полученные с помощью разработанного способа водные растворы фуллерена охарактеризованы по размеру частиц методом динамического светорассеяния и их структуре методами электронной просвечивающей микроскопии и малоуглового рассеяния нейтронов.

Получены УФ-, ИК-спектры водных растворов фуллерена.

Методом МАЛДИ-масс-спектрометрии (MALDI-TOF) показано отсутствие в образцах водных растворов фуллерена продуктов окисления и гидроксилирования фуллерена.

С помощью метода элементного анализа определено содержание в водных растворах фуллерена остаточных количеств 1-метил-2-пирролидона – растворителя, используемого при получении растворов.

Проведено изучение биологической безопасности водного раствора фуллерена, полученного новым способом на мышах линии BALB/c при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 30 дней. Показано отсутствие патологических изменений в тканях и органах животных, однако отмечена тенденция к образованию гранулем в некоторых тканях, наличие которых было отнесено к последствиям введения раствора фуллерена.

На культурах клеток изучена цитотоксичность водных растворов фуллерена с помощью теста с нитротетразолием синим (NBT-теста) и МТТ-теста метаболической активности клеток. Показано отсутствие цитотоксического эффекта испытуемых растворов.

Также в главе 3 описаны результаты применения метода тонкослойной хроматографии в анализе водных растворов фуллерена. Отмечены различия в хроматографическом поведении водных растворов и растворов фуллерена в толуоле.

Глава 4 содержит перечень показателей и норм качества для стандартного образца водного раствора фуллерена, определенных на основании изложенных в главе 3 результатов исследований, а также описание результатов, полученных при хранении растворов в течение двух лет. Зафиксировано отсутствие значимых изменений качества растворов по установленным показателям после 2 лет хранения.

Общие выводы диссертационной работы полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам исследования.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Одним из достоинств диссертационных исследований является разработка нового способа получения водного раствора фуллерена, в результате которой автору удалось получить стабильную водную дисперсию фуллерена без применения ароматических растворителей. Разработанный способ позволяет значительно повысить концентрацию фуллерена в растворе по сравнению с другими, ранее разработанными способами, и был защищен патентом Российской Федерации.

Полученные с помощью нового способа водные растворы фуллерена были охарактеризованы с помощью современных методов анализа. При проведении исследования автор не ограничивался применением одного метода для каждого из определяемых показателей, а подтверждал и дополнял полученные результаты с помощью других, арбитражных, методов, когда это было возможно, что также является несомненным достоинством работы.

Несмотря на общее положительное впечатление от работы, при ее рассмотрении возникли следующие вопросы и замечания:

1. Почему работа посвящена созданию стандартного образца (СО) водного раствора фуллерена, а не активной фармацевтической субстанции (АФС)? Обычно разработка АФС и СО происходит параллельно. Почему выбрана концентрация раствора 1 мг/мл?
2. Для чего проводились доклинические исследования (хроническая токсичность) СО? Система стандартизации СО не регламентирует таких исследований. Доклинические исследования целесообразно проводить для АФС.
3. Для приготовления СО водного раствора фуллерена использован СО или субстанция фуллерен С60 (неотек продакт 99,5%)? Почему выбрана именно эта субстанция? Как была стандартизована производителем используемая субстанция фуллерена С60 (неотек продакт 99,5%), а также какие показатели были включены в сертификат качества используемой субстанции?
4. Как были выбраны параметры стандартизации СО? Как планируется использование раствора фуллерена внутрь, наружно или парентерально? В работе не представлено ссылок на ГФ РФ, на нормативную базу для разработки СО.
5. В диссертации нет подробного описания методик контроля качества стандартного образца водного раствора фуллерена, так как они должны

быть представлены в проекте нормативной документации. Информация о методиках представлена в тексте диссертации разрозненно, частично – в главе «Материалы и методы», частично – в главе 3, что не совсем удобно для восприятия. Отсутствуют данные по валидации разработанных методик.

6. Почему 1-метил-2-пирролидон отнесен к специфичным примесям? ГФ РФ предусматривает определение для СО родственных примесей и остаточных органических растворителей. Проводились ли стрессовые испытания, определение продуктов деградации?
7. Почему для количественного определения основного компонента стандартного образца не предусмотрен расчетный метод? Проводилось ли определение всех возможных примесей для этого, помимо определения 1-метил-2-пирролидона?
8. Спецификация представлена не в соответствии с существующими требованиями, скорее по содержанию ближе к сертификату качества на стандартный образец. Отсутствует раздел «Методы», использованы не корректные единицы измерения показателей. Желательно в приложении к работе представить проект НД и лабораторный регламент (хотя бы титульный лист), поскольку в тексте о них есть упоминание.
9. В списке литературы отсутствуют отечественные источники, нет данных за последние три года, в основном представлены ресурсы за период с 1985 г. по 2018 г.
10. В тексте диссертации встречаются опечатки и неудачные формулировки.

Однако перечисленные выше замечания и вопросы носят уточняющий характер и не снижают научной и практической ценности диссертационного исследования.

Заключение

Таким образом, диссертация Турецкого Евгения Александровича на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук на тему: «Создание стандартного образца водного раствора фуллерена» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи – разработки способа получения водного раствора фуллерена, а также методик анализа стандартного образца для контроля качества лекарственных препаратов на его основе, имеющей существенное значение для отечественной фармацевтической науки.

По объему и уровню исследований, актуальности поставленных задач, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Турецкого Евгения Александровича соответствует требованиям пункта 16 Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), утвержденным приказом ректора Сеченовского университета от 31.01.2020 г. №0094/Р, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Турецкий Евгений Александрович, заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Официальный оппонент
Директор Центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН) Министерства образования и науки Российской Федерации, доктор фармацевтических наук (специальность 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия)

«04» 10 2021 г. Потанина Ольга Георгиевна

117198 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2
Телефон +7 (495) 787-38-03, доб. 20-93
e-mail: microly@mail.ru

Подпись Потаниной Ольги Георгиевны заверяю:
Ученый секретарь Учёного совета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН), д. ф.-м. н., профессор Савчин В.М