

На правах рукописи

Филатова Елена Викторовна

**ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СИСТЕМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ  
НА ОСНОВЕ МИКРОСФЕР ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА.**

Специальность 03.01.04 Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа выполнена в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
**Бонарцева Гарина Александровна**

**Официальные оппоненты:** **Сербин Александр Владимирович**  
доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук, лаборатория химии полиэлектролитов и медико-биологических полимеров, главный научный сотрудник

**Новикова Светлана Петровна**  
доктор биологических наук, доктор химических наук, профессор, Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая лабораторией

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Химиотерапия является обязательным этапом лечения онкологических заболеваний. Наряду с цитотоксичностью, необходимой для химиотерапии, применение цитостатиков имеет побочное токсическое действие в первую очередь на ткани, наиболее сходные с опухолевыми по скорости пролиферации (костный мозг, лимфатическая система, желудочно-кишечный тракт, репродуктивные органы), что приводит как к лечебному, так и к токсическому эффектам. Кроме того, химиотерапевтические препараты обладают узким диапазоном «широты терапевтического действия». Побочные и токсические эффекты при химиотерапии отмечаются гораздо чаще, чем при других видах лекарственной терапии. Для химиотерапевтических лекарств характерны и специфические осложнения: отсроченная токсичность, характеризующаяся скрытым (латентным) периодом в проявлении токсического действия, большим разнообразием и сложностью ее выявления; отсутствие избирательной токсичности; местно-раздражающее действие, эмбриотоксичность, тератогенность, мутагенность, канцерогенность, функциональная кумуляция, нейротоксичность и иммунотоксичность. Поэтому лечение онкологических больных химиопрепаратами сопровождается различными по своим проявлениям токсичными и побочными эффектами. Разработка малотоксичных лекарственных форм с контролируемым высвобождением цитостатиков позволит осуществлять длительную химиотерапию без многократного введения препарата, что должно значительно улучшить качество жизни пациента. Поэтому создание и исследование новых малотоксичных лекарственных систем с контролируемым высвобождением цитостатиков на основе природного биосовместимого полимера ПОб является актуальным.

**Цель и задачи работы.** Целью настоящей работы являлась разработка и исследование лекарственных систем контролируемого высвобождения цитостатиков на основе природного биополимера поли-3-оксибутирата. В соответствии с целью исследования в работе решались следующие задачи: получить природный биоразлагаемый полимер ПОб; наработать партии микросфер с включением различных цитостатиков; провести исследование кинетики высвобождения цитостатиков из полученных микросфер *in vitro*; изучить биосовместимость и биодеструкцию полученных микросфер; оценить их цитотоксичность и химиотерапевтическое воздействие на культуре ткани опухолевых клеток рака груди человека; а также исследовать общую токсичность полученных лекарственных систем *in vivo*.

**Научная новизна работы.** Впервые созданы лекарственные биополимерные системы на основе поли-3-оксибутирата методом одноэтапного эмульгирования с инкапсулированными цитостатиками (дексаметазон, хлорамбуцил, этопозид, паклитаксел (ПКЛ), метотрексат, доксорубин). Установлено, что профиль высвобождения цитостатических лекарственных

веществ из микросфер соответствует динамике контролируемого высвобождения. Впервые показано, что биополимерные микросферы с инкапсулированным ПКЛ обладают меньшей токсичностью и большей эффективностью по сравнению с традиционной лекарственной формой, что доказано опытами, проведенными как на культуре клеток рака груди человека, так и в экспериментах *in vivo*. Разработан метод получения микросфер с включением нано-частиц металлов золота и железа.

**Научно-практическая значимость работы.** Результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания новых малотоксичных лекарственных форм этопозида и хлорамбуцила (в том числе двойной лекарственной формы) с контролируемым высвобождением. Показано, что из всех изученных микрочастиц с включением цитостатиков наиболее оптимальным кинетическим показателем отвечают микрочастицы с включением ПКЛ — основы противоопухолевого препарата Таксол. Лекарственные формы с контролируемым высвобождением ПКЛ обеспечивают уровень высвобождения ЛВ, необходимый для проявления цитостатического действия на клетки. Полученные лекарственные формы являются малотоксичными для всего организма, что создает реальные предпосылки для замены в будущем активно применяемого в медицинской практике препарата Таксол, имеющего много побочных эффектов. Получение микросфер с включением нано-частиц металлов золота и железа может послужить основой для разработки систем направленной доставки цитостатиков, а также для диагностических целей.

**Методы исследования.** Микросферы с инкапсулированными цитостатиками получали с использованием метода одноэтапного эмульгирования. Молекулярную массу полимера определяли методом вискозиметрии, используя уравнение Марка-Хаувинка-Куна. Содержание цитостатика в опытном растворе определяли спектрофотометрически. Для определения степени биодegradации микросфер с ЛВ использовали микрофотографии, полученные при помощи световой микроскопии. При исследовании выживаемости опухолевых клеток молочной железы под воздействием тестируемого агента использовался стандартный МТТ-тест (колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток). При исследовании микросфер с наночастицами золота и железа использовались методы сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии.

**Степень достоверности полученных результатов.** Получение и исследование микросфер с инкапсулированными цитостатиками производилось с использованием современных научных методик. Кинетические характеристики высвобождения ЛВ из микросфер были получены путем аппроксимации экспериментальных данных. Результаты исследования обсуждались на семинарах лаборатории, докладывались на конференциях и публиковались в реферируемых зарубежных и отечественных изданиях.

**Личный вклад автора.** Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и выполнение экспериментов, обработку данных, оформление и публикацию результатов.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- 1) Метод одноэтапного эмульгирования позволяет получать биополимерные микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата с инкапсулированными цитостатиками: дексаметазоном, хлорамбуцилом, этопозидом, паклитакселом, метотрексатом, доксорубицином.
- 2) Кинетика высвобождения лекарственных веществ из биополимерных микросфер в водной среде *in vitro* на ранней стадии хорошо описывается уравнением модели диффузии по Фику.
- 3) Профиль высвобождения цитостатических лекарственных веществ из микросфер соответствует кинетике контролируемого высвобождения. Наиболее оптимальными кинетическими показателями пролонгированного высвобождения обладают микрочастицы с включением паклитаксела.
- 4) Противоопухолевая активность *in vitro* микросфер с различными ЛВ: паклитакселом, этопозидом и хлорамбуцилом зависит как от кинетики высвобождения ЛВ из микрочастиц, так и от биологической активности действующего ЛВ на опухолевые клетки линии MFC-7 *in vitro*.
- 5) Биополимерные микросферы с инкапсулированным ПКЛ обладают меньшей токсичностью и большей эффективностью по сравнению с традиционным препаратом Таксол.
- 6) В биополимерные микросферы можно также инкапсулировать наночастицы металлов: золота и железа.

**Апробация работы.** Материалы диссертации представлены на следующих конференциях: 1-я Международная научная школа — Нано-2009. Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах, г. Обнинск; International conference “Biocatalysis-2009”, Arkhangelsk; Научно-практической конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2010; III Всероссийская конференция «Нанотехнологии в онкологии 2010», МНИОИ им. П. А. Герцена, Москва; The 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Мальта, 2010; The 26th Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension, 2010, New-York, USA; International conference MirTec, Базель, Швейцария, 2010; The 27th Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension, 2011, New-York, USA; Международная конференция, Современные достижения бионаноскопии, 2011, Москва, ФФ МГУ; IV Всероссийская конференция по наноматериалам «НАНО-2011», Москва; Всероссийская школа-семинар Научный потенциал - XXI "Композитные наноматериалы", Бекасово, МО, 2011; 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Стамбул,

Турция, 2012; TechConnect World 2012 Conference and Trade Show, Santa Clara, California, USA.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 статей, 4 обзора, 13 тезисов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения и списка цитируемой литературы (206 ссылок). В Заключении излагаются итоги выполненного исследования, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 75 рисунков и 9 таблиц.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

*Получение микробиологического высокоочищенного ПОБ.* Клетки продуцента поли-3-оксибутирата *Azotobacter chroococcum* выращивали при 28°C в течение 48 часов на косяках агаризованной среды Эшби. Для получения биомассы с высоким содержанием ПОБ штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* пересеивали и выращивали на жидкой среде Берка.

*В работе были получены партии микросфер различного диаметра с инкапсулированными цитостатиками* (ПКЛ, метотрексат, хлорамбуцил, дексаметазон, этопозид, доксорубин и метотрексат). Микросферы получали с использованием метода одноэтапного эмульгирования. ЛВ и ПОБ (Мм от 220 до 280 кДа) в соотношении 1:4 растворяли в хлороформе (4 мл) и постепенно добавляли к 250 мл 1,2% водного раствора поливинилового спирта (ПВС). Перемешивание производили в течение 2 час при помощи механической верхнеприводной мешалки RZR 2021 (Heidolph, Германия) при 600-2000 об/мин или гомогенизатора SilentCruiser M (Heidolph, Германия) при 20 000 об/мин. Процент включения ЛВ в микросферах определяли спектрофотометрически (по максимумам поглощения: 242 и 278 нм для ПКЛ; 253 и 290 нм для доксорубина; 242 нм для дексаметазона; 290 нм для метотрексата; 259 и 305 нм для хлорамбуцила и 288 нм для этопозиды) при сравнении с контрольным раствором ПОБ и ЛВ в хлороформе. Средний диаметр и стандартное отклонение у полученных партий микросфер определяли по микрофотографиям.

*Исследование контролируемого высвобождения цитостатиков из полимерных микросфер in vitro.* Контролируемое высвобождение цитостатиков из микросфер проводили при 37°C в термостате ТС-1/20 (Россия) в 4 мл 0.025М калий-фосфатного буфера (рН = 7,4) с небольшим добавлением эмульгатора (0.05% Triton X-100 по объему): при перемешивании в пробирках на шейкере со скоростью 300 об/мин. При исследовании кинетики высвобождения цитостатиков через заданные интервалы времени (через 1-2 часа в течение первых суток, потом через 1-2 суток) микросферы отделяли от буфера центрифугированием при 14000 об/мин на центрифуге 5702 R, (Eppendorf, Германия) и добавляли 4 мл свежего буфера. Содержание цитостатика в опытном растворе определяли спектрофотометрически

(контроль — 0,025 М калий-фосфатный буфер, рН 7,2). Остаточное содержание цитостатиков в микросферах определяли, растворяя их в заданном количестве растворителя, с последующим определением концентрации в растворе спектрофотометрически, сравнивая с контрольными растворами известной концентрации.

*Исследование деградации микросфер из ПОБ in vitro.* Для определения среднего диаметра, а также степени биodeградации микросфер из ПОБ с инкапсулированными ЛВ использовали микрофотографии, полученные при помощи световой микроскопии (микроскоп Биомед 1 Вар.2 Россия) с цифровым окуляром MYscore 300M (Webbers, Тайвань); в определенные промежутки времени в период от 1 до 30 суток с начала деградации небольшую часть микросфер отбирали, исследовали микроскопически и фотографировали.

Для оценки химиотерапевтической активности микросфер исследовали выживаемость опухолевых клеток молочной железы человека линии MFC-7 под воздействием тестируемого агента. Выживаемость вычисляли по формуле:  $N[\%] = (\text{кол-во клеток в опыте} / \text{кол-во клеток в контроле}) \times 100$ . При этом использовался стандартный МТТ-тест, как наиболее показательный метод при работе с культурами опухолевых клеток. Микросферы диспергировали в среде культивирования и добавляли к культивируемым клеткам в различных концентрациях. Предварительно сухие микросферы стерилизовали при 100°C в течение 10 мин. Изучаемые микросферы тестировали в 4-х параллельных измерениях при концентрациях от 10 мкг до 3 мг/мл. Суспензию биополимерных микросфер в концентрации 3 мг/мл, не содержащих ЛВ использовали в качестве отрицательного контроля. Измерения проводили через 24 и 48 часов.

Химиотерапевтическая активность микросфер с ЛВ также была продемонстрирована при помощи световой микроскопии с окраской клеток по Гимзе.

*Оценка острой токсичности.* Биополимерные микросферы (диаметр микросфер —  $41 \pm 7$  мкм) вводили 6 мышам внутрибрюшинно в концентрации 8 мг/мл в объеме 1,0 мл на мышь (вес - 25 г.) или 40 мл/кг (320 мг микросфер/кг), в качестве растворителя использовали стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl) с добавлением в качестве эмульгатора полисорбата (Sigma-Aldrich, USA) (0.025%). Контрольным животным вводили стерильный физиологический раствор (0.9% NaCl) с добавлением в качестве эмульгатора полисорбата (0.025%) в том же объеме. Наблюдение за животными проводили в течение 60 суток.

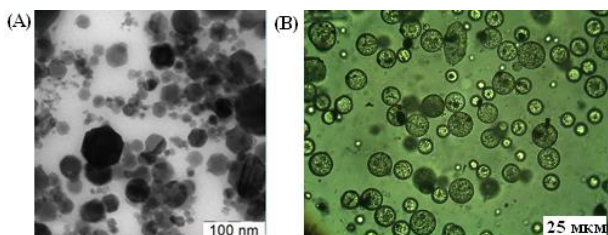
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Микросферы с включением наночастиц оксида железа Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

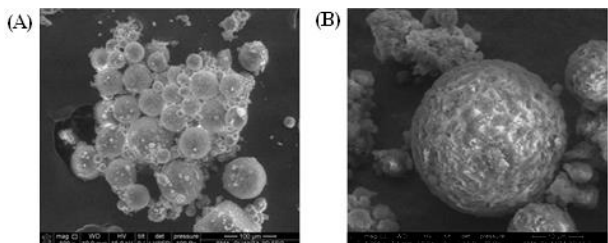
Наиболее современным направлением в химиотерапии является создание лекарственных форм цитостатиков для направленной доставки в очаг поражения. Локальная доставка химиотерапевтических агентов может производиться с помощью магнитного поля. В наших

экспериментах были использованы магниточувствительные наночастицы оксида железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

В целях получения магнитоуправляемых микросфер методом одноэтапного эмульгирования были получены и исследованы микросферы с включением наночастиц оксида железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Морфология микросфер представлена на рис. 1, откуда можно видеть, что сферы имеют средний размер 25,2 мкм, округлую форму, в теле сфер четко фиксируются скопления наночастиц оксида железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . На рис. 2 при разном увеличении представлены микрофотографии тех же микросфер с включением  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , полученные методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), где морфология микросфер видна более четко.



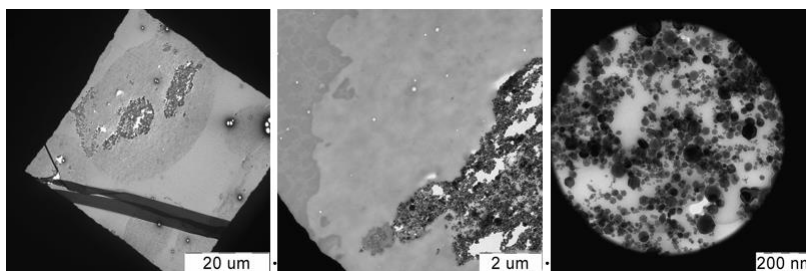
**Рис. 1.** (А) — наночастицы оксида железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (СЭМ); (В) — микросферы, содержащие наночастицы оксида железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (Световая микроскопия).



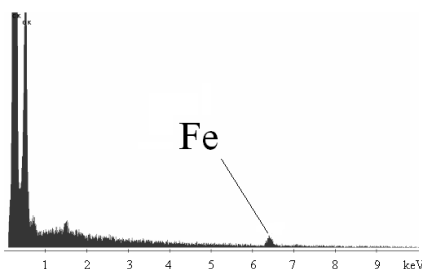
**Рис. 2.** Микросферы, содержащие наночастицы оксида железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (СЭМ). Увеличение: (А) — в 500 раз, (В) — в 5000 раз.

Наличие металла железа в микросферах подтверждено методом спектрального анализа, а также при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (рис. 3, 4).

Полученные результаты могут быть использованы для адресной доставки цитостатиков в целях уменьшения системного побочного отрицательного воздействия. при создании новых химиотерапевтических препаратов направленного действия.



**Рис. 3.** Трансмиссионная электронная микроскопия. Последовательное увеличение.



**Рис. 4.** Спектр микросфер, инкапсулированных наночастицами оксида железа  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .



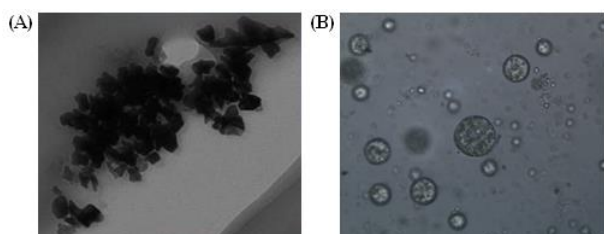
## 2. Микросферы с включением наночастиц золота.

Для успешного развития химиотерапии прежде всего необходима своевременная диагностика. Золотые наночастицы могут использоваться для диагностики локализации опухоли с помощью методов оптической томографии, а именно в методике по контролю накопления наночастиц золота в опухолях неинвазивными высокоразрешающими методами оптической когерентной томографии (ОКТ) и в дифференциальной флуоресцентной томографии (ДФТ).

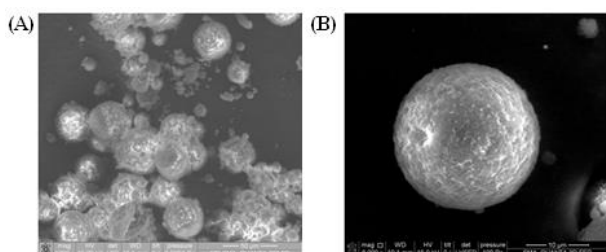
Методом одноэтапного эмульгирования нами были получены микросферы с включением наночастиц золота (Au). Для изучения структуры микросфер с включением наночастиц использовалась световая и сканирующая электронная микроскопия (см. рис. 5, 6). На микрофотографии видно, что сферы правильной формы, поверхность микросфер однородная.

Для обнаружения в матриксе сферы наночастиц золота мы использовали последовательное увеличение от 300 до 200000 раз. При таком приближении происходит плавление микросферы и выявляются нано-частицы золота (Au) (см. рис. 7 А). Также нами был использован метод ТЭМ, который посредством ультратонкого среза в парафине выявил в расплавленном матриксе микросферы нано-частицы золота (Au) (см. рис. 7 Б, В).

На основе данного метода получения микросфер с включением наночастиц золота возможна дальнейшая разработка диагностических методов с применением оптической когерентной томографии (ОКТ) и в дифференциальной флуоресцентной томографии (ДФТ).

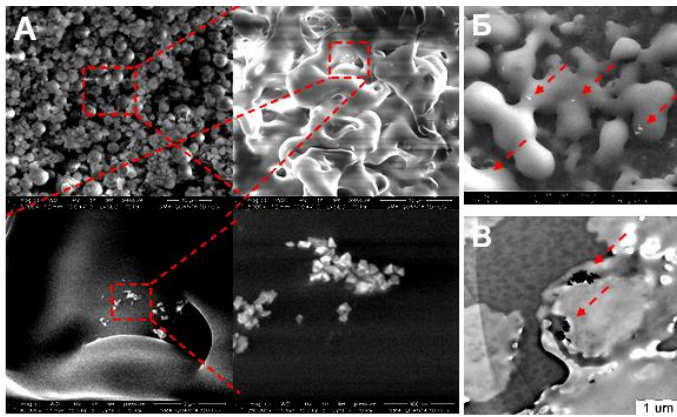


**Рис. 5.** (А) — нано-частицы золота (СЭМ); (В) — микросферы с включением нано-частиц золота, средний размер микросфер 30 мкм (световая микроскопия).



**Рис. 6.** Микросферы с включением наночастиц золота (Au). (А) — увеличение в 1200 раз, (В) — увеличение в 6000 раз. Сканирующая электронная микроскопия.

Полученные микросферы с включением наночастиц металлов золота (Au) и оксида железа  $Fe_2O_3$  требуют дальнейших исследований и могут послужить основой для систем адресной доставки цитостатиков, а также для диагностических целей.

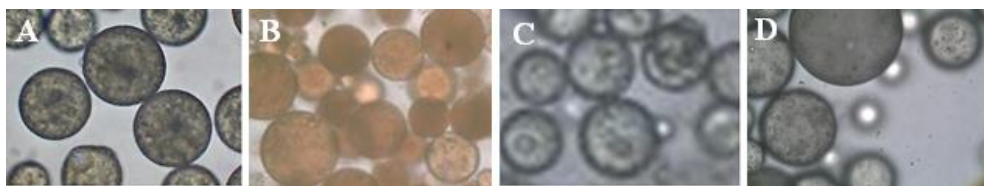


**Рис. 7.** Микрофотографии наночастиц золота (Au) в полимерной матрице ПЭГ микросфер, полученные методом СЭМ — А (показана серия фотографий с последовательно возрастающим увеличением) и Б, и методом ТЭМ — В (ультратонкий срез в парафине).

### 3. Исследование контролируемого высвобождения цитостатических лекарственных веществ из микросфер на основе ПЭГ.

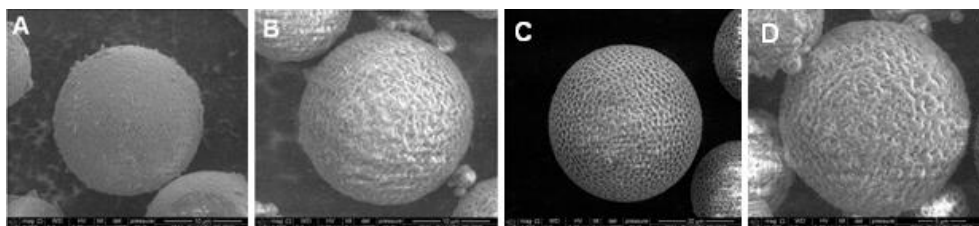
*Морфология микросфер с инкапсулированными противоопухолевыми ЛВ на основе ПЭГ.*

В целях получения и исследования лекарственных систем с контролируемым высвобождением цитостатиков методом одноэтапного эмульгирования были получены следующие микросферы: микросферы с включением дексаметазона, доксорубина, этопозид, ПКЛ, хлорамбуцила, метотрексата. Форму и размер микросфер определяли с помощью световой микроскопии (см. рис. 8).



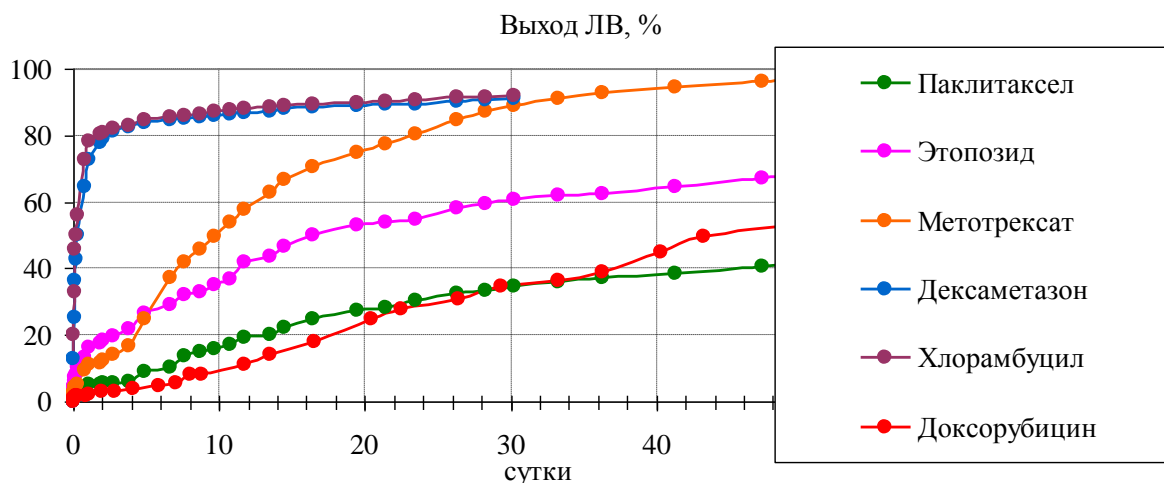
**Рис. 8.** Биополимерные микросферы с инкапсулированными противоопухолевыми ЛВ на основе ПЭГ: А — с паклитакселем; В — с доксорубином; С — с дексаметазоном; D — с хлорамбуцилом. Световая микроскопия. Средний размер микросфер —  $40 \pm 10$  мкм; массовая доля включенного ЛВ —  $(10 \pm 3)\%$ .

Структуру микросфер и рельеф поверхности изучали при помощи сканирующей электронной микроскопии, которая позволяет более детально изучить структуру поверхности микрочастиц. На рисунке 9 представлены микрофотографии, сделанные при помощи сканирующей электронной микроскопии. Как видно по фотографиям, морфология сфер различна и зависит от инкапсулированного ЛВ.



**Рис. 9.** Микрофотографии микросфер (с инкапсулированными ЛВ на основе ПЭГ: А — с хлорамбуцилом, В — с дексаметазоном, С — с доксорубином, D — с этопозидом).

Сравнительный профиль высвобождения различных ЛВ. Суммарный профиль высвобождения доксорубина, этопозид, хлорамбуцила, метотрексата и паклитаксела представлен на рис. 10. Выход исследуемых лекарственных веществ из микросфер наблюдался в течение 60 суток.



**Рис. 10.** Сравнительная кинетика высвобождения цитостатиков из биополимерных микросфер на основе ПОБ. Средний размер микросфер —  $40 \pm 10$  мкм; массовая доля включенного ЛВ —  $(10 \pm 3)\%$ .

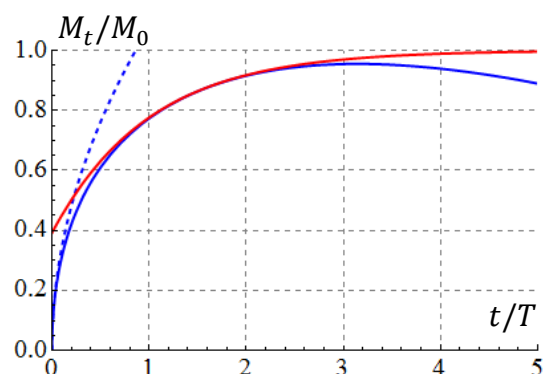
Так как профиль высвобождения доксорубина аналогичен профилю ПКЛ, а профиль дексаметазона аналогичен профилю хлорамбуцила, для дальнейшего сравнительного изучения кинетики высвобождения ЛВ были отобраны три из шести противоопухолевых веществ: ПКЛ, хлорамбуцил и этопозид.

Для анализа данных профиля высвобождения удобно использовать идеализированную модель диффузии в которой делается ряд допущений: в начальный момент времени ЛВ равномерно распределено внутри полимера с начальной концентрацией ЛВ меньшей, чем максимальный предел растворимости; коэффициент диффузии считается постоянным в процессе высвобождения и не зависящим от концентрации; не происходит накопления вещества на границе выхода из микросфер. Приближенные решения уравнения диффузии (закона Фика) на ранней и поздней стадии высвобождения можно представить в виде

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{3}{\pi^2} \left( 2 \sqrt{\frac{\pi t}{T}} - \frac{t}{T} \right), \quad \frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-\frac{t}{T}\right), \quad T = \frac{r^2}{\pi^2 D},$$

где  $M_t$  и  $M_0$  — количества высвободившегося и изначально загруженного ЛВ в полимерную матрицу в момент времени  $t$ , а  $T$  — характеристическое время диффузионного процесса, которое определяется через радиус микросфер  $r$  и коэффициент диффузии  $D$ .

На рис. 11 приведены графики высвобождения для ранней стадии (сплошная синяя линия) и поздней стадии (красная линия) в зависимости от времени в единицах характеристического времени  $T$ . Также на рис. 11 приведен график фиковского высвобождения на ранней стадии в приближение Хигучи, которое учитывает лишь квадратный корень от времени ( $M_t \sim \sqrt{t}$ ).



**Рис. 11.** Высвобождение ЛВ в фиковской модели

Как видим из графиков в области времен от  $T$  до  $2T$  профили высвобождения, описываемые формулами ранней и поздней стадиями, практически не отличаются друг от друга. В качестве условной границы, когда заканчивается ранняя стадия и начинается поздняя, можно выбрать  $t^* = T$ , чему соответствует выход вещества  $\approx 77\%$ .

Обычно в литературе приближение Хигучи распространяют до значений выхода ЛВ  $M_t < 0.6 M_0$ . Однако, для фиковской диффузии из сравнения графиков (пунктирная и сплошная синие линии на рис. 11) видно, что профили высвобождения практически не отличаются для значений выхода ЛВ в интервале  $M_t < 0.3 M_0$ .

На ранней стадии скорость высвобождения пропорциональна  $1/\sqrt{t}$  и стремится к бесконечности в начале координат при  $t \rightarrow 0$ . Таким образом, фиковская диффузия дает объяснение «берст» эффекту — «взрывному» высвобождению ЛВ в начальной фазе высвобождения. На поздней стадии ( $t > T$ ) скорость высвобождения будет экспоненциально стремиться к нулю со временем затухания  $T$ .

Полученные профили высвобождения позволяют вычислить коэффициенты диффузии ЛВ путем аппроксимации данных на ранней стадии высвобождения. В качестве параметра для аппроксимации служит характеристическое время  $T$ , из которого после вычисления коэффициента диффузии по формуле  $D = r^2/(\pi^2 T)$  (см. табл. 1). Как видим, паклитаксел имеет наименьший коэффициент диффузии и соответственно большее время высвобождения.

| Лекарственное вещество | Характ время $T$ , сутки | Коэфф. диффузии $D$ , $\text{см}^2/\text{с}$ |
|------------------------|--------------------------|--|
| Хлорамбуцил            | 0,75                     | $2.5 \cdot 10^{-11}$                         |
| Этопозид               | 64,7                     | $2.9 \cdot 10^{-13}$                         |
| Паклитаксел            | 282                      | $6.6 \cdot 10^{-14}$                         |

**Таблица. 1.** Коэффициенты диффузии ЛВ для фиковской модели

### Эмпирические модели кинетического профиля высвобождения

В реальной ситуации коэффициент диффузии не является постоянной, а зависит от множества факторов. Поэтому при аппроксимации данных релиза пользуются эмпирическими моделями высвобождения. Приведем результаты аппроксимации данных релиза для четырех широко применяемых моделей: моделей нулевого и первого порядка, а также моделей, которые основываются на уравнениях Higuchi и Peppas-Korsmeyer.

Модель нулевого порядка описывается уравнением  $M_t = V_0 t$ . Скорость высвобождения  $V_0$  в модели нулевого порядка не зависит от времени. График представляет собой линию, выходящую из начала координат. Обычно эта модель применима в самой начальной фазе высвобождения. Скорости высвобождения (коэффициенты при  $t$ ) позволяют судить о темпе протекания начального «берст»-эффекта.

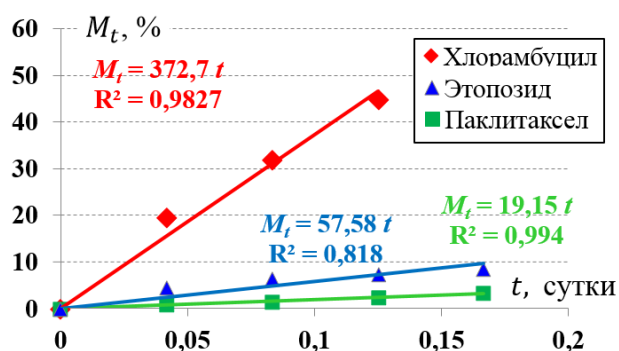


Рис. 12. Модель нулевого порядка.

На рис. 12 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели нулевого порядка. Как видим из результатов аппроксимации, наибольшим «берст»-эффектом обладает хлорамбуцил.

Модель первого порядка описывается уравнением

$$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_0}\right) = k_1 - k_2 t,^{**}$$

где  $k_1, k_2$  — постоянные процесса. Это уравнение эквивалентно уравнению

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - k_3 \exp(-k_2 t),$$

где  $k_3 = e^{k_1}$  — постоянный предэкспоненциальный множитель, а обратная величина

$k_2$  имеет смысл времени затухания. Именно такой зависимостью описывается поздняя стадия «фииковской» диффузии. Поэтому моделью первого порядка лучше описывать конечную стадию высвобождения ЛВ. На рис. 13 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели первого порядка. Достаточно высокие коэффициенты достоверности ( $R^2 \approx 0.95$ ) для этопозида и паклитаксела указывают, что у них уже началась поздняя стадия высвобождения. Значение коэффициента достоверности для хлорамбуцила ( $R^2 \approx 0.9$ ) по-видимому можно объяснить деградацией полимера.

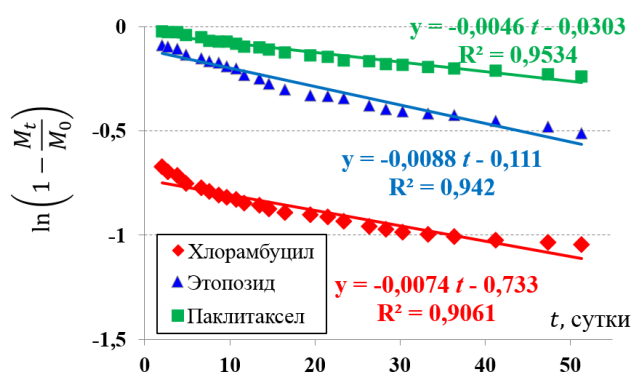


Рис. 13. Модель первого порядка.

### Модель Higuchi описывается

уравнением

$$M_t = k\sqrt{t},$$

где  $k$  — постоянная процесса. Именно такой зависимостью описывается ранняя стадия «фииковской» диффузии, в которой постоянная  $k$  связана с коэффициентом диффузии соотношением  $k = 6\sqrt{\frac{D}{\pi r^2}} M_0$ .

Поэтому моделью Higuchi лучше описывать начальную стадию высвобождения ЛВ ( $M_t < 0.6 M_0$ ). На рис. 14 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели Higuchi, для которой графики в координатах  $(\sqrt{t}, M_t)$  должны быть прямыми. Высокие коэффициенты достоверности ( $R^2 \approx 0.97$ ) указывают, что ранняя стадия высвобождения имеет фииковский диффузионный характер.

Интересно сравнить полученные результаты с аппроксимацией данных для фииковской модели. Введенное характеристическое время может быть вычислено через полученный коэффициент  $k$ :  $T = \frac{36}{\pi^3} \left(\frac{M_0}{k}\right)^2$ . Для рассчитанных коэффициентов хлорамбуцила, этопозида и паклитаксела для характеристических времен соответственно получим 0.9, 85, 336 суток, что находится в хорошем согласии с фииковской аппроксимацией.

### Модель Peppas-Korsmeyer

описывается уравнением

$$M_t = k t^n,$$

где  $k, n$  — постоянные процесса. В зависимости от показателя степени  $n$  различают следующие типы высвобождения:  $n = 0,5$  — фииковская диффузия,  $0,5 < n < 1$  — аномальная фииковская диффузия,  $n = 1$  — модель нулевого порядка. На рис. 15 показаны результаты аппроксимации высвобождения в модели Peppas-Korsmeyer. Близость показателя экспоненты к 0,5 для исследуемых ЛВ указывает на фииковский характер диффузии.

Высвобождение этопозида и ПКЛ протекает гораздо слабее, чем у хлорамбуцила, при этом отсутствует ярко выраженный берст-эффект. Вероятно, это объясняется более сильным гидрофобным взаимодействием данных ЛВ с полимером. Также, по-видимому, большое

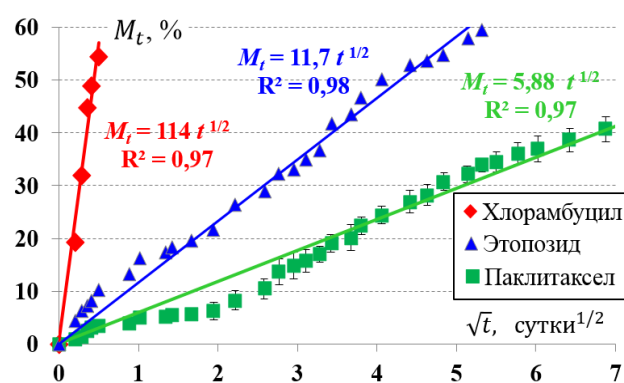


Рис. 14. Модель Higuchi.

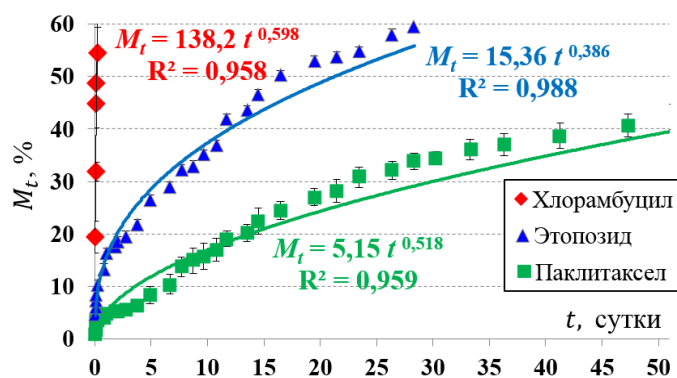


Рис. 15. Модель Peppas-Korsmeyer.

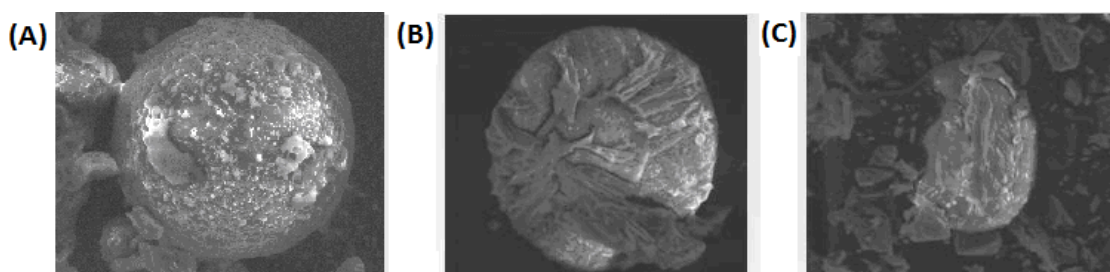
значение имеют водородные связи функциональных групп ЛВ с гидроксильной и карбонильной группами ПОБ, и степень этого связывания также влияет на скорость высвобождения. На профиль высвобождения лекарственного вещества также влияют концевые группы ПОБ, которые, являясь функциональными группами, взаимодействуют с мобильными молекулами ЛВ, и, следовательно, замедляют их диффузию, а также разрыхляют структуру ПОБ, т.е. мешают образованию совершенной структуры биополимера.

Полученные данные по кинетике высвобождения послужили основанием для выбора наиболее оптимального ЛВ по параметрам пролонгации высвобождения — паклитаксела.

#### 4. Гидролитическая деструкция микросфер.

Одновременно с изучением кинетики высвобождения ПКЛ из полимерной матрицы *in vitro* было изучено изменение морфологии микросфер при гидролитической деструкции *in vitro*. Деграцию полимерной матрицы микросфер с включением ПКЛ визуально оценивали через определенные промежутки времени.

На рис. 16 показано, как происходит процесс деграции микросфер с ПКЛ в течение трех месяцев. Деструкция включает следующие стадии: разрыхление полимерной матрицы микросферы, разделение ее на сегменты, деструкция полимера до мономерных звеньев. Через три месяца сферы превращаются в аморфную массу полимера с последующим полным его растворением.



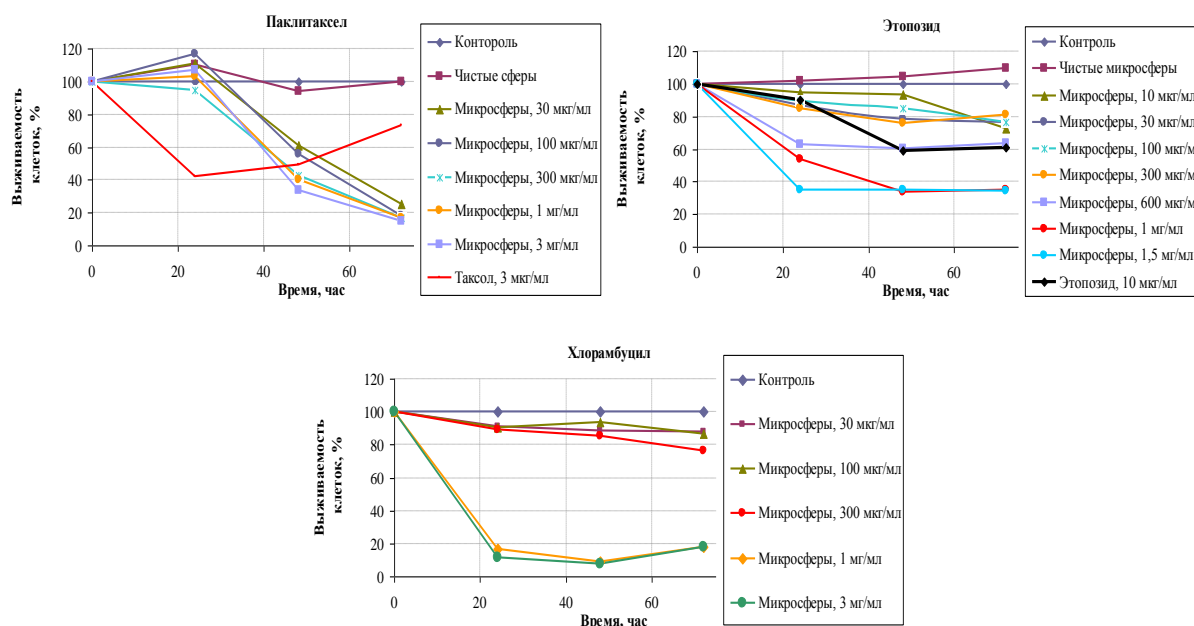
**Рис. 16.** Гидролитическая деграция микросфер с включением паклитаксела (массовая доля ЛВ в полимере — 10,3%, средний диаметр микросфер — 41мкм): (А) — 1 сутки; (В) — 30 суток; (С) — 90 суток инкубации в 0,025М калий-фосфатном буфере ( $pH=7,4$ ) при 37°C. Сканирующая электронная микроскопия.

Представленные микрофотографии убедительно демонстрируют постепенную гидролитическую деструкцию биополимерных микросфер с инкапсулированным ПКЛ в течение 90 суток. Сравнивая полученные результаты с литературными данными по деграции микросфер на основе полилактидов и полигликолидов, можно отметить, что гидролитическая деструкция микросфер из ПОБ происходит значительно медленнее, что способствует более пролонгированному высвобождению ЛВ.

## 5. Результаты исследования биосовместимости микросфер с различными противоопухолевыми ЛВ.

Были проведены исследования биосовместимости микросфер с различными противоопухолевыми ЛВ — ПКЛ, этопозидом и хлорамбуцилом. Результаты исследования биосовместимости микросфер с различными цитостатиками на опухолевых клетках линии рака груди человека MFC-7 представлены на рис. 17.

Из анализа данных на графиках следует, что микросферы, не содержащие ЛВ, практически не влияют на жизнеспособность клеток, что свидетельствует о высокой биосовместимости биополимера ПОБ. Напротив, микросферы, содержащие противоопухолевые ЛВ — ПКЛ, хлорамбуцил и этопозид — вызывают выраженное подавление роста клеток, которое зависит от времени инкубации клеток и от концентрации микрочастиц. Так, через 24 часа традиционный препарат Таксол подавляет пролиферацию клеток, в то время как микросферы еще не оказывают такого действия. К трем суткам ситуация меняется — микросферы с инкапсулированным паклитакселом подавляют рост опухолевых клеток практически на 100%, в то время как активность препарата Таксол падает.



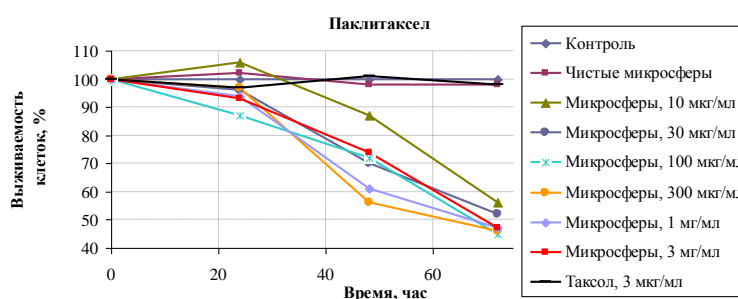
**Рис. 17.** Влияние различных микросфер в различных концентрациях, содержащих паклитаксел (10,3%), этопозид (7,1%) и хлорамбуцил (11,3%), на выживаемость опухолевых клеток линии MFC-7.

С увеличением срока инкубации клеток ингибирующий эффект микросфер усиливался и достигал максимума к 3 суткам эксперимента. Более того, ингибирующий эффект микросфер на рост клеток носит концентрационно-зависимый характер. Интересно, что используемый для сравнения традиционный препарат Таксол вызывал максимальное подавление роста клеток через 1 и 2 суток, а затем его ингибирующий эффект заметно ослабевал. Это связано,



по-видимому, с тем, что ПКЛ в традиционной форме утилизируется клетками или распадается в среде, в результате чего его концентрация со временем снижается и это приводит к возобновлению роста клеток. Полученные нами биополимерные микросферы вызывают стабильное подавление роста с 1 по 3 сутки эксперимента, обеспечивая постоянное поступление ПКЛ в культуральную среду и способствуя поддержанию постоянной действующей концентрации, что и повышает эффективность микросфер по сравнению с традиционной лекарственной формой на основе кремафора.

Для доказательства пролонгированного действия микросфер с включением ПКЛ были использованы микросферы после инкубации *in vitro* в 25 мМ фосфатном буфере в течение 45 суток. Из данных показанных на рис. 18 видно, что даже после 45 дневного высвобождения ПКЛ из микросфер, причем при всех использованных концентрациях микросфер от 10 мкг/мл до 3 мг/мл, они оставались действенными в отношении опухолевых клеток линии MFC-7.



**Рис. 18.** Влияние различных концентраций микросфер биополимерной системы, содержащей паклитаксел (10,3%) на выживаемость опухолевых клеток линии MFC-7 после инкубации микросфер *in vitro* в 25 мМ фосфатном буфере при 37°C в течение 45 суток.

Таким образом противоопухолевая активность микросфер сохраняется в течение долгого времени даже при инкубации в водной среде при 37°C, что говорит о высокой стабильности ПКЛ в новой полимерной форме.

## 6. Оценка биосовместимости микросфер с помощью параметра IC<sub>50</sub>.

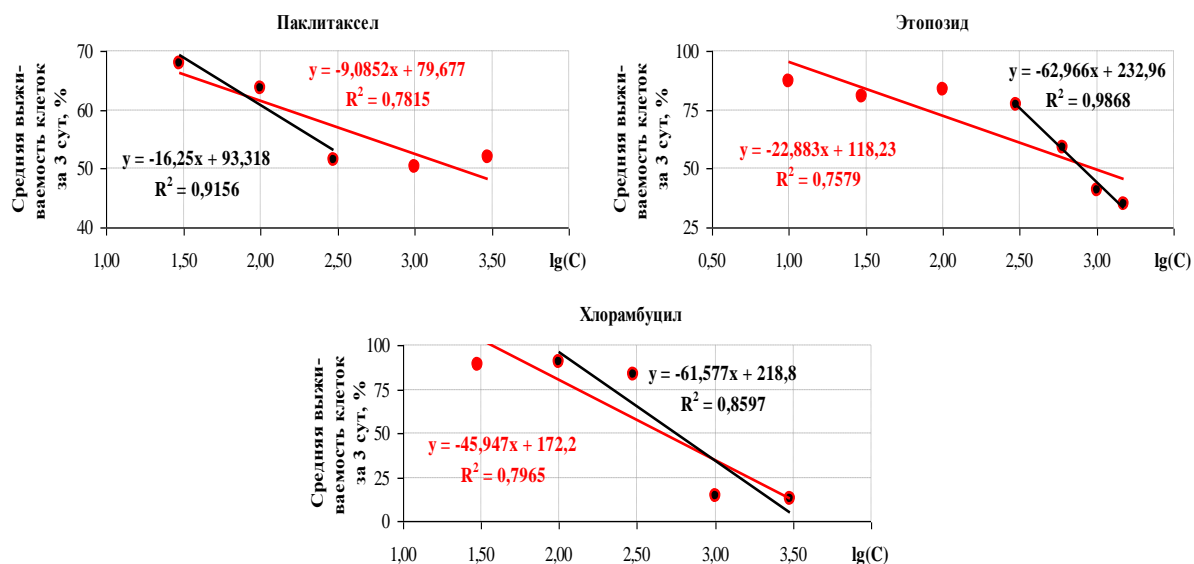
Для оценки биосовместимости микросфер был использован стандартизированный параметр IC<sub>50</sub>, который широко используется в качестве основного критерия оценки действия лекарственных препаратов на культуры клеток в экспериментах *in vitro* и рекомендуется для использования как в нормативных документах [ГОСТ Р ИСО 10993.5 99] для доклинических испытаний лекарственных препаратов и медицинских изделий, так и в научной литературе, в том числе для оценки биосовместимости полимерных микрочастиц с инкапсулированными ЛВ. Параметр IC<sub>50</sub> представляет собой концентрацию ЛВ, которая вызывает 50% подавление роста клеток в условиях *in vitro* при использовании стандартных тестов оценки выживаемости клеток, например, ХТТ-тест.

Для расчета параметра  $IC_{50}$  для каждого препарата микрочастиц, содержащих различные ЛВ, были построены графики зависимости **выживаемости опухолевых клеток рака груди человека линии MFC 7** от концентрации микрочастиц БЛК в логарифмической шкале, ориентируясь на классическое уравнение «концентрация-эффект»:

$$E = E_{\max} \frac{C}{C + K},$$

где  $E$  — ингибирующий эффект ЛВ,  $C$  — концентрация ЛВ,  $K$  — константа ингибирующего эффекта ЛВ на клетки.

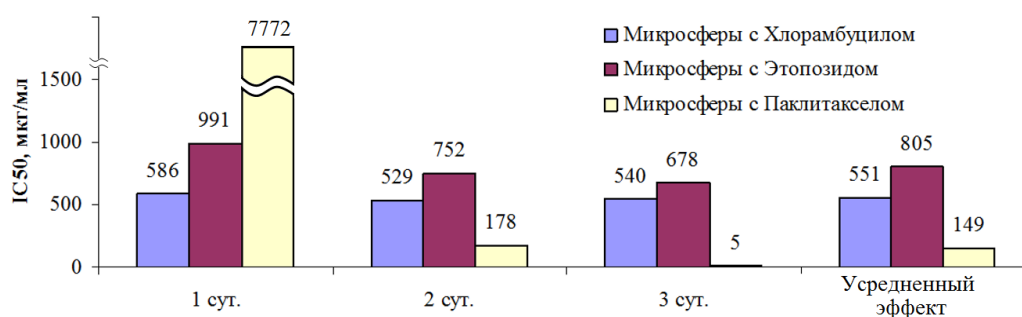
Из графиков на рис. 19 видно, что увеличение ингибирующего воздействия на рост клеток (взяты усредненные значения по срокам инкубации 1, 2 и 3 суток) носило концентрационно-зависимый характер не во всем диапазоне концентраций микросфер.



**Рис. 19.** Зависимость ингибирующего эффекта микросфер, содержащих паклитаксел, этопозид и хлорамбуцил, от их концентрации в логарифмической шкале на опухолевые клетки рака груди человека линии MFC-7.

Согласно уравнению «концентрация-эффект» представленные зависимости имеют S-образную форму кривой, в которой присутствует центральный участок, хорошо аппроксимируемый линейной функцией, и периферийные нелинейные участки в области низких и высоких значений логарифма концентрации. Поэтому для построения графика был выбран не весь диапазон используемых значений концентрации, а лишь 3 или 4 значения (черные точки), которые с высокой точностью (коэффициент корреляции  $R^2 > 85\%$ ) описывается линейной функцией, из уравнения которой можно вычислить значение  $IC_{50}$ , как значение концентрации, вызывающей 50% подавление роста клеток.

По разработанной методике были рассчитаны параметры  $IC_{50}$  для 1, 2 и 3 суток инкубации, значения которых представлены на диаграмме рис. 20. Наименьшим усредненным по времени значением  $IC_{50}$  обладают микросферы с ПКЛ, что свидетельствует об их максимальной противоопухолевой эффективности *in vitro*. Необходимо отметить также, что противоопухолевая эффективность микросфер с ПКЛ многократно возрастает с увеличением срока инкубации с клетками, что свидетельствует об их выраженном пролонгированном эффекте. Высокие значения  $IC_{50}$  связаны, по-видимому, с медленным высвобождением ПКЛ в 1-ые сутки, что согласуется с данными кинетики его высвобождения из микросфер, в результате чего цитотоксическая концентрация не достигалась. Косвенно об этом свидетельствует то, что ПКЛ в традиционной лекарственной форме — Таксол проявлял свою максимальную эффективность уже на 1-ые сутки. Подобный возрастающий противоопухолевый эффект с течением времени наблюдается и у микросфер с этопозидом, но в гораздо меньшей степени.



**Рис. 20.** Значения  $IC_{50}$ , рассчитанные для ингибирующего эффекта микросфер, содержащих хлорамбуцил, этопозид и паклитаксел на клетки линии MFC-7 при инкубации в течение 1, 2 и 3 суток и для усредненного эффекта по всей продолжительности эксперимента.

Усредненная противоопухолевая эффективность у микросфер, содержащих этопозид, оказалась минимальной, многократно уступающей эффективности микросфер с ПКЛ. Это, по-видимому, связано с противоопухолевой активностью самого действующего вещества, которое значительно уступает по этому параметру ПКЛ. Промежуточное значение по параметру усредненного  $IC_{50}$  заняли микросферы с хлорамбуцилом, однако их цитотоксический эффект практически не зависел от времени. Это может быть связано с кинетикой высвобождения хлорамбуцила из микросфер, а именно, с выраженным «взрывным эффектом» высвобождения ЛВ в 1-ые сутки. В этом случае, максимальный цитотоксический эффект, как и в случае с традиционными лекарственными формами, достигается в 1-ые сутки и далее не возрастает.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что биополимерные сферы без лекарственных веществ являются биосовместимыми с опухолевыми клетками и не проявляют цитотоксичности. Полимерные сферы с этопозидом и хлорамбуцилом имеют различное токсичное воздействие на культуру опухолевых клеток, а именно, хлорамбуцил действует активнее и сильнее подавляет рост культивируемых клеток за короткое время (80%

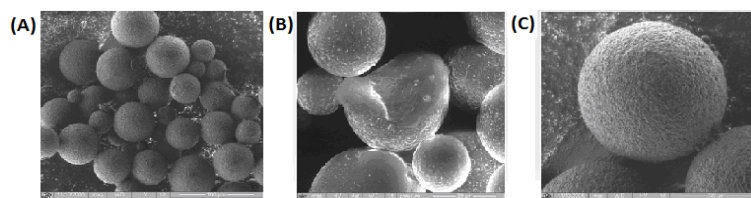
за 24 часа), что согласуются с данными по кинетике высвобождения (рис. 4), где отмечено, что за первые сутки эксперимента высвобождение ЛВ из матрицы полимера достигает 78%. Этопозид действует слабее (процент подавления роста клеток за 48 часов не превышает 45%), однако в дальнейшем (по данным исследования кинетики высвобождения *in vitro* (рис. 10) имеет длительный пролонгирующий эффект высвобождения, что может быть оптимально при проведении длительной химиотерапии. Представленные данные позволяют предположить, что хлорамбуцил может быть использован для нанесения первичного шокового удара на опухолевые клетки с дальнейшим длительным поддерживающим цитотоксическим эффектом. Этопозид, напротив, может быть использован для проведения длительной химиотерапии, так как позволяет поддерживать действующую терапевтическую дозу благодаря постоянному длительному высвобождению. Таким образом, на основании анализа кинетики высвобождения изученных ЛВ *in vitro*, а также анализа результатов экспериментов с использованием культуры опухолевых клеток выявлены принципиальные отличия полученных пролонгированных лекарственных форм хлорамбуцила и этопозида. Результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания и изучения новых малотоксичных лекарственных форм этопозида и хлорамбуцила с контролируемым высвобождением. Также возможно создание двойной лекарственной формы с включением как этопозида, так и хлорамбуцила для достижения гарантированного терапевтического эффекта.

Микросферы с инкапсулированными противоопухолевыми ЛВ значительно различаются по характеру их цитотоксической активности, который зависит как от собственной противоопухолевой активности инкапсулированного действующего ЛВ, так и, по-видимому, от кинетики высвобождения ЛВ из микросфер. Наиболее выраженную пролонгированную противоопухолевую активность продемонстрировали микросферы, содержащие ПКЛ, что и определило их использование в дальнейшем в исследованиях *in vivo*.

Созданные лекарственные формы на основе ПОБ с контролируемым высвобождением цитостатиков требуют дальнейших исследований и доклинических испытаний и могут явиться основой для создания новых малотоксичных противоопухолевых лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением.

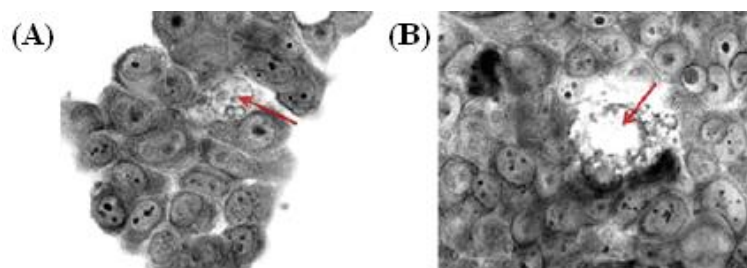
## **7. Исследование химиотерапевтической активности биополимерных микросфер с паклитакселом на культуре ткани опухолевых клеток МФС-7.**

Нами были получены микросферы с включением ПКЛ на основе ПОБ (Мм – 255 кДа). Массовая доля инкапсулированного ЛВ составила 10,3%, средний размер — 41 мкм. На рис. 21 показаны микрофотографии, сделанные при помощи сканирующей электронной микроскопии. На микрофотографиях видно, что поверхность микросфер относительно гладкая, внутри микросфера наполнена веществом, и ЛВ в полимерной матрице распределено равномерно.



**Рис. 21.** Микросферы с включением паклитаксела (массовая доля ЛВ в полимере - 10,3%, средний диаметр микросфер – 41 мкм) Сканирующая электронная микроскопия. (А) — увеличение в 1000 раз; (В) — в 3100 раз (микросфера в разрезе); (С) — в 3000 раз.

Полученные микросферы были изучены в опытах на культуре ткани рака груди человека MFC7. Культура опухолевых клеток MFC7 была выбрана нами потому, что Таксол чаще всего используется при лечении рака груди человека. На рис. 22 показано воздействие микросфер с ПКЛ на опухолевые клетки. Из этих данных можно видеть, что через 24 часа (рис. 22 А) происходит начало гибели опухолевых клеток под действием микросфер с инкапсулированным ПКЛ; а через 48 часов отчетливо видно, что окружающие микросферу опухолевые клетки погибли (рис. 22 В).



**Рис. 22.** Взаимодействие микросфер (включение паклитаксела в микросферах — 10,3%, средний диаметр микросфер — 41 мкм) с клетками рака груди человека линии MFC-7 в течение 24 часов (А) и 48 часов (В), стрелками указаны биополимерные микросферы. После 2-х суток культивации окружающие микросферу клетки погибли.

## **8. Оценка острой токсичности биополимерных микросфер с инкапсулированным паклитакселом *in vivo*.**

Для проверки острой токсичности были получены микросферы с повышенным содержанием ПКЛ – 20%. Были проведены эксперименты *in vivo* на мышах для оценки выживаемости мышей при применении препарата ПКЛ в полимерной форме, результаты которых приведены в табл. 2.

Если при введении препарата Таксол в дозе 16-32 мг/кг наблюдается 100% смертность животных, то при введении ПКЛ, инкапсулированного в микросферы в той же дозе, смертность не наблюдается, что свидетельствует о значительном снижении токсичности инкапсулированного ПКЛ.

| Группа  | Под-группа | Препараты             | Пало/ всего | Сроки гибели, сут |
|---|------------|-----------------------|-------------|-------------------|
| 1. Отрицательный контроль чистые микросферы без ЛВ                | 1.1        | Микросферы, 320 мг/кг | 0/6         | –                 |
|   | 1.2        | Микросферы, 800 мг/кг | 0/6         | –                 |
|   | 1.3        | Интактный контроль    | 0/6         | –                 |
| 2. Опыт - биополимерные микросферы (содержание паклитаксел 20±1%) | 2.1        | Микросферы, 320 мг/кг | 0/6         | –                 |
|   | 2.2        | Микросферы, 160 мг/кг | 0/6         | –                 |
|   | 2.3        | Микросферы, 80 мг/кг  | 0/6         | –                 |
| 3. Положительный контроль, препарат Таксол                        | 3.1        | Таксол, 64 мг/кг      | 6/6         | 0,0,0,0,0,1       |
|   | 3.2        | Таксол, 32 мг/кг      | 6/6         | 1,1,4,4,6,8       |
|   | 3.3        | Таксол, 16 мг/кг      | 1/6         | 5                 |

**Таблица. 2.** Оценка острой токсичности биополимерных микросфер при внутрибрюшинном введении мышам-самцам линии 006.

Таким образом, на основании изучения биосовместимости, химиотерапевтической активности *in vitro* и оценки острой токсичности *in vivo* биополимерных микросфер, инкапсулированных ПКЛ, можно сказать, что созданная лекарственная форма ПКЛ на основе ПОБ обладает длительным контролируемым высвобождением ЛВ при сохранении высокой эффективности, а также является малотоксичной по сравнению с традиционным препаратом Таксол.

### ВЫВОДЫ

- 1) Получены биополимерные микрочастицы на основе поли-3-оксибутирата методом одноэтапного эмульгирования с инкапсулированными цитостатиками: дексаметазоном, хлорамбуцилом, этопозидом, паклитакселом, метотрексатом, доксорубицином.
- 2) Анализ профилей высвобождения цитостатиков из микросфер с использованием математической модели нулевого порядка дает количественное описание «берст»-эффекта на начальной стадии высвобождения, а с помощью моделей «Higuchi» и «Peppas-Korsmeyer», показано, что ранняя стадия высвобождения имеет диффузионный характер по Фику. По модели диффузии Фика рассчитаны коэффициенты диффузии. Анализ данных с помощью модели первого порядка указывает, что на поздней стадии высвобождения хлорамбуцила происходит гидролитическая деструкция полимера.
- 3) Установлено, что профиль высвобождения цитостатических лекарственных веществ из микросфер соответствует динамике контролируемого высвобождения. Из изученных микрочастиц с включением цитостатиков наиболее оптимальным кинетическим показателем пролонгированного высвобождения отвечают микрочастицы с включением паклитаксела.

- 4) Противоопухолевая активность *in vitro* микросфер с различными ЛВ: паклитакселом, этопозидом и хлорамбуцилом зависит как от кинетики высвобождения ЛВ из микрочастиц, так и от биологической активности действующего ЛВ на опухолевые клетки линии MFC-7 *in vitro*.
- 5) Биополимерные микросферы с инкапсулированным ПКЛ обладают меньшей токсичностью и большей эффективностью по сравнению с традиционным препаратом Таксол, что доказано опытами, проведенными как на культуре клеток, так и в экспериментах *in vivo*, что служит предпосылкой для создания малотоксичной лекарственной формы ПКЛ на основе биополимера ПОБ.
- 6) Получены микросферы с включением наночастиц металлов золота и железа, на основе которых возможна разработка систем направленной доставки цитостатиков.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ.

### Статьи (периодические издания):

1. **Филатова Е.В.**, Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. «Малотоксичные микросферы для направленной доставки доксорубина». *Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология*, 2018, том 5, № 4, с. 30-33.
2. **Филатова Е.В.**, Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. «Микросферы на основе полиоксибутирата как перспективные системы для адресной доставки дексаметазона». *Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология*, 2018, том 5, № 4, с.24-29.
3. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.G., **Filatova E.V.**, Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E., Artsis M.I. «Kinetics and mechanism of poly(3-hydroxybutyrate) degradation». *Вестник Казанского технологического университета*, 2014, том 17, № 4, с. 145-151.
4. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., **Filatova E.V.**, Soboleva G.M., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shaïtan K.V., Popov V.O., Kirpichnikov M.P. «Sustained release of the antitumor drug paclitaxel from poly(3-hydroxybutyrate)-based microspheres». *Biochemistry, Supplemental Series B*, 2012 V. 6, № 1, p. 42-47.
5. **Филатова Е.В.**, Яковлев С.Г., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А. «Пролонгированное высвобождение хлорамбуцила и этопозида из полимерных микросфер из поли-3-оксибутирата». *Прикладная биохимия и микробиология*, 2012, т. 48, № 6, с. 662–667.
6. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Voinova V.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Zernov A.L., **Filatova E.V.**, Bagrov D.V., Rebrov A.V., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L. «Hydrolytic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and its derivatives:

characterization and kinetic behavior». *Chemistry and Chemical Technology*, 2012, V. 6, № 4, p. 385-392.

7. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.G., **Filatova E.V.**, Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. «Hydrolytic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), Polylactide and their Derivatives: Kinetics, Crystallinity, and Surface Morphology». *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2012, V. 556, № 1, p. 288-300.
8. Бонарцев А.П., Яковлев С.Г., **Филатова Е.В.**, Соболева Г.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Попов В.О., Кирпичников М.П. «Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата». *Биомедицинская химия*, 2011, т. 57, № 2, с. 232-240.
9. Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., **Филатова Е.В.**, Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. «Биосинтез сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б». *Прикладная биохимия и микробиология*, 2010, т. 46, № 3, с. 1-8.
10. Босхомджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., **Филатова Е.В.**, Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. «Сравнительное изучение кинетики биодеградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата». *Биомедицинская химия*, 2009, т. 55, № 6, с. 702-712.
11. Босхомджиев А.П., Бонарцев А.П., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Багров Д.В., **Филатова Е.В.**, Бонарцева Г.А., Иорданский А.Л. «Гидролитическая деструкция биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата. Кинетический и структурный аспекты». *Пластические массы*, 2009, т. 8, с. 13-18.

#### Обзоры:

1. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., **Filatova E.V.**, Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E., Artsis M.I. «Trends in New Generation of Biodegradable Polymers (Part 3)». *Applied Research on Polymer Composites* 342 p. ISBN 978-1-77188-038-1, AAP Research Notes on Polymer Engineering Science and Technology, CRC Press (Taylor&Francis group), Apple Academic Press Oakville, Canada, 2015, p. 63-80
2. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.G., **Filatova E.V.**, Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E., Artsis M.I. «Trends in Polyblend Compounds: Part II». *Polymers and Polymeric Composites:*



*Properties, Optimization, and Applications*, AAP Research Notes on Polymer Science Engineering and Technology, Apple Academic Press New York, 2014, p. 57-77

3. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.G., **Filatova E.V.**, Ivanov E.A., Bagrov D.V. «Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and its derivatives: characterization and kinetic behavior». *Advances in Kinetics and Mechanism of Chemical Reactions* (edited by G.E. Zaikov), Apple Academic Press New-York, 2013, v. 9, p. 122-138
4. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.G., **Filatova E.V.**, Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. «Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), and its Derivatives: Characterization and Kinetic Behavior». *Advances in Kinetics and Mechanism of Chemical Reactions*. (ed. by G. Zaikov) Ch, 9, pp 121-139. 2013 APPLE Academic Press, Canada.

#### **Тезисы докладов:**

1. Yakovlev S.G., ... , Filatova E.V., ..., «In vitro anticancer activity of poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles loaded with antitumor drug Paclitaxel». *TechConnect World 2012 Conference and Trade Show*, Santa Clara, California, USA, 2012.
2. Yakovlev S.G., ... , Filatova E.V., ..., «In vitro anticancer activity of poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles loaded with antitumor drug Etoposide» *8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Стамбул, Турция, 2012, с. 138.
3. Филатова Е.В., ..., «Микросферы на основе природного биоразлагаемого полимераполи-3-оксибутирата с включением микрочастиц гидроксиапатита». *Всероссийская школа-семинар Научный потенциал - XXI "Композитные наноматериалы"*, Бекасово, 2011, с. 36-37.
4. Багров Д.В., ..., Филатова Е.В., ..., «Исследование морфологии поверхности пленок поли(3-гидроксибутирата) нанометровой толщины». *IV Всероссийская конференция по наноматериалам «НАНО-2011»*, 2011, Москва, Россия, сборник материалов, с. 575.
5. Багров Д.В., ..., Филатова Е.В., ..., «Изучение морфологии поверхности ультратонких пленок из поли(3-оксибутирата)». *Пятая международная конференция, Современные достижения бионаноскопии*, 2011, Москва, ФФ МГУ, Сборник тезисов, с.11-12.
6. Bonartsev A.P., Filatova E.V., ..., «Poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles loaded with paclitaxel cause prolonged antiproliferative action» *The 27th Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension*, May 21-24, 2011, New-York, USA. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2011, Suppl. 1, Vol. 13, p. A69.

7. Bonartsev A.P., Filatova E.V., ..., «Biopolymer Microspheres Loaded with Antitumor Drugs and Inorganic Nanoparticles». *Материалы международной конференции MirTec*, Базель, Швейцария, 20-24 сентября 2010 г., P-157, с. 79.
8. Filatova E.V., ..., «Iron oxide nanoparticles incapsulated in microspheres on the base of poly(3-hydroxybutyrate)». *Материалы международной конференции 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Валетта, Мальта, 2010 г., с. 108.
9. Bonartsev A.P., Filatova E.V., ..., «Long-term in vitro antiproliferative action of poly(3-hydroxybutyrate) microparticles loaded with paclitaxel». *The 26th Annual Scientific Meeting of the American Society of Hypertension*, May 21-24, 2010, New-York, USA, PO-21. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2010, Suppl. 1, Vol. 12, p. A27.
10. Yakovlev S.G., Filatova E.V., ..., «In vitro anticancer activity of poly(3-hydroxybutyrate) microparticles loaded with antitumor drugs». *7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Valletta, Malta, 2010, p. 106.
11. Багров Д.В., ..., Филатова Е.В., ..., «Исследование структуры и процесса разложения пленок из поли-3-гидроксибутирата и его композитов с лекарственными веществами». Третья Всероссийская конференция «Нанотехнологии в онкологии 2010», МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва, Россия, 2010, сборник тезисов, с. 15-18.
12. Filatova E.V., ..., «Microspheres and membranes on the base of biocompatible and biodegradable polymer, poly(3-hydroxybutyrate), loaded with antitumor drugs». *International conference "Biocatalysis-2009"*, 2009, Arkhangelsk, p.135.
13. Филатова Е.В., ..., «Микросферы с инкапсулированными наночастицами оксида железа на основе поли-3-оксибутирата». *Сборник тезисов 1-ой Международной научной школы «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах»*, 2009, ГКНПЦ им. М.В. Хруничева. с. 361-362.

По теме диссертации опубликовано 11 статей в журналах из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и 4 обзора, отражающие основной объем диссертационной работы. Результаты работы также были представлены на 9 международных и 4 всероссийских конференциях.