

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,**  
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук  
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук  
аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 25 июня 2020 г. № 22

О присуждении **Третьяковой Дарье Сергеевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови» по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия принята к защите 17 апреля 2020 г. (протокол № 13) диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (11797 Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10), действующим на основании приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2013 года.

Соискатель, Третьякова Дарья Сергеевна, 1993 года рождения, в 2015 году окончила Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «Химик».

В 2019 году соискатель окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН) с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по специальности «Химические науки». В настоящее время работает младшим научным сотрудником Лаборатории химии липидов ФГБУН ИБХ РАН. Диссертация выполнена в Лаборатории химии липидов ФГБУН ИБХ РАН.

Научный руководитель - доктор химических наук, **Водовозова Елена Львовна**, заведующий Лабораторией химии липидов ФГБУН ИБХ РАН.

Официальные оппоненты: **Маслов Михаил Александрович**, доктор химических наук, доцент, директор Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "МИРЭА - Российский технологический университет", и **Остроумова Ольга Сергеевна**, доктор биологических наук, доцент, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией моделирования мембран и ионных каналов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук дали *положительные* отзывы

на диссертацию.

Ведущая организация **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова)**, Москва, в своем *положительном* заключении, подготовленном Мелик-Нубаровым Н.С., подписанном д.х.н., чл.-корр. РАН Ярославовым А.А. - зав. каф. высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, к.х.н., доцентом Ужиновой Л.Д. - уч. секретарем каф. высокомолекулярных соединений, д.х.н., чл.-корр. РАН Калмыковым С.Н. - деканом Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, и утвержденном проректором МГУ им. М.В. Ломоносова д.ф.-м.н. Федяниным Андреем Анатольевичем, указала, что диссертационная работа Третьяковой Д.С. является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития биоорганической химии, и соответствует всем требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, внесенными Постановлений Правительства РФ от: 21 апреля 2016 г. № 335; 02 августа 2016 г. № 748; от 29 мая 2017 г. № 650), а сам диссертант заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - «биоорганическая химия».

Соискатель имеет 11 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 5 работ, объемом 6.57 печ. л., опубликованных в рецензируемых научных изданиях из перечня, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах в диссертации отсутствуют. Работы по теме диссертации, в которые Третьякова Д.С. внесла основной или значительный вклад :

1. **Третьякова Д.С.**, Онищенко Н.Р., Вострова А.Г., Водовозова Е.Л. Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с белками плазмы крови // Биорг. Хим. **2017**.Т. 43. N. 6. С. 661-673.

2. **Tretiakova D.**, Onishchenko N., Boldyrev I., Mikhalyov I., Tuzikov A., Bovin N., Evtushenko E., Vodovozova E. Influence of stabilizing components on the integrity of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer // Colloids Surf. B. **2018**. V. 166. P. 45–53.

3. **Tretiakova D.S.**, Alekseeva A.S., Galimzyanov T.R., Boldyrev A.M., Chernyadyev A.Yu., Ermakov Yu.A., Batishchev O.V., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. Lateral stress profile and fluorescent lipid probes. FRET pair of probes that introduces minimal distortions into lipid packing // BBA Biomembranes. **2018**. V. 1860. P. 2337-2347.

4. **Tretiakova D.**, Svirshchevskaya E., Onishchenko N., Alekseeva A., Boldyrev I., Kamyshinsky R., Natykan A., Lokhmotov A., Arantseva D., Shobolov D., Vodovozova E. Liposomal Formulation of a Melphalan Lipophilic Prodrug: Studies of Acute Toxicity, Tolerability, and Antitumor Efficacy // Curr. Drug.Deliv. **2020**. 10.2174/1567201817666200214105357

5. *Tretiakova D.S.*, Khaidukov S.V., Babayants A.A., Frolova I.S., Shcheglovitova O.N., Onishchenko N.R., Vodovozova E.L. Lipophilic prodrug of methotrexate in the membrane of liposomes promotes their uptake by human blood phagocytes // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. № 1 (44). P. 99-109.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**Отзыв официального оппонента д.х.н. Маслова М.А.** – положительный, содержит следующие вопросы и замечания:

1. В качестве активного компонента липосомы содержат пролекарства – липофильные производные мелфалана и метотрексата. Каким образом располагаются остатки мелфалана и метотрексата относительно поверхности мембраны в случае липосом, сформированных фосфатидилхолином, и какие изменения в расположении пролекарств возможны при добавлении экранирующих молекул?

2. Остается ли молекула метотрексата «видимой» для клеток крови и имеются ли на поверхности моноцитов специфические рецепторы, способствующие более быстрому поглощению (и накоплению в точке 60 мин) липосом с пролекарством. Изменялась ли кинетика поглощения липосом моноцитами в присутствии свободного метотрексата (или свободного GM<sub>1</sub>, в случае липосом с которым зафиксировано самое большое накопление в моноцитах)?

3. При изучении взаимодействия липосом с альбумином автор делает предположение, что наличие липофильного мелфалана и фосфатидилинозитола делает поверхность липосом «более «гладкой», равномерной», где «объемистая отрицательно заряженная группа фосфатидилинозита скомпенсирована небольшим положительно заряженным остатком мелфалана» (стр. 99). Почему из рассмотрения различных взаимодействий исключена полярная группа фосфатидилхолина, содержание которого в липосомах составляет 80%?

4. Введение молекул пролекарства мелфалана создает локальные дефекты поверхности (стр. 95). Что автор вкладывает в понятие «дефекты»?

**Отзыв официального оппонента д.б.н. Остроумовой О.С.** – положительный, содержит замечания к незначительным погрешностям представления иллюстративного материала и некоторым не вполне удачным словосочетаниям, а также содержит следующие дискуссионные вопросы:

1. В обзоре литературы описываются различные компоненты белковой короны наночастиц, в том числе, липосом. Проводились ли в работе исследования связывания с липосомами белков, отличных от компонентов системы комплемента?

2. Хотелось бы уточнить у автора работы причины, по которым не было проведено исследования взаимодействия липосом с пролекарством метотрексата с сывороточным альбумином.

3. В диссертации не упоминается, проводились ли параллельно исследования связывания компонентов системы комплемента с липосомами, нагруженными пролекарством мелфалана. Во введении автор ссылается на ранее опубликованные

данные о «различиях в связывании ряда функционально важных белков плазмы крови, в том числе компонентов системы комплемента» с липосомами, содержащими метотрексат и мелфалан. Однако сравнительные исследования взаимодействий различных препаратов с белками плазмы следует проводить на одних и тех же образцах плазмы.

4. Проводились ли исследования *in vivo* влияния липосом, включающих мелфалан, на гемопоэз? Известно, что основным побочным эффектом при лечении мелфаланом является угнетение системы кроветворения, клеток костного мозга.

5. Использовались ли автором какие-либо методы количественного анализа данных, полученных иммуоблоттингом?

**Отзыв ведущей организации** – положительный, содержит следующие вопросы и замечания:

1. В разделах изучения целостности липосом с помощью метода вытекания кальцеина разброс данных на графиках указан только на рисунках 28А и 30, причем не указан тип ошибки (SD/SE) и число измерений. На рисунках 13,14 и 31 разброс данных на кривых отсутствует.

2. В разделе исследований взаимодействия сывороточного альбумина с липосомами с помощью ИК-спектроскопии приведен только один пример спектра, полученного в ходе инкубации (рис. 20). Не представлены экспериментальные спектры для различных липосом и их комплексов с белком.

3. В ИК-спектрах не проанализированы изменения пиков  $\text{PO}_2$  и Амид II и нет информации по сигналам от характеристических фрагментов полярных головных групп фосфолипидов и пролекарства (холиновая группа, фенильное кольцо мелфалана).

**Отзыв на автореферат** д.х.н., проф., чл.-корр. РАН Чвалуна Сергея Николаевича – гл. науч. сотр. лаборатории функциональных полимерных структур ФГБУН Института Синтетических Полимерных Материалов им. Н.С. Ениколопова РАН. Отзыв положительный, без замечаний.

**Отзыв на автореферат** д.б.н. Торховской Татьяны Ивановны – вед. науч. сотр. ФГБУН «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». Отзыв положительный, содержит пожелание о возможных дальнейших исследованиях.

**Отзыв на автореферат** к.б.н. Ибрагимовой Миляуши Якубовны – доц. кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета. Отзыв положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается наличием у них значительного опыта исследовательской работы в областях, близких к тематике диссертационной работы. Это подтверждается их публикациями в ведущих отечественных и международных журналах. Тематика

научных исследований официального оппонента Маслова М.А. связана с синтезом новых катионных липидов и конструированием липосом, в том числе декорированных липидными конъюгатами нацеливающих лигандов, для генотерапии опухолевых заболеваний. Работы официального оппонента Остроумовой О.С. связаны с исследованиями модельных и биологических липидных мембран, изучением их фазовых состояний и процессов формирования в них ионных каналов под влиянием физиологически активных веществ. Представители ведущей организации, сотрудники кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, занимаются фундаментальными исследованиями по оптимизации конструкций липосом как систем доставки лекарств. Высокая квалификация и большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяют им объективно оценить научную новизну рассматриваемой диссертации, теоретическую и практическую значимость ее результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем комплексных исследований в области создания липосомальных препаратов двух важнейших в химиотерапии опухолей лекарств – мелфалана и метотрексата – получены новые данные о взаимодействии липосом с рядом функционально важных белков плазмы крови человека, определяющих судьбу липосом в кровотоке, их стабильность и взаимодействия с иммунокомпетентными клетками. Исследования влияния различных экранирующих компонентов в мембране на состояние липосом в плазме крови имеют фундаментальное и практическое значение. Актуальность этих исследований заключается, в первую очередь, в поиске альтернативы так называемому пегилированию, которое широко применяется для стабилизации систем доставки лекарств, в том числе липосом. В то же время, в последние годы появляется все больше данных об иммуногенности пегилированных наночастиц. В данной диссертационной работе показано, что в качестве стабилизирующих молекул для липосом могут применяться природные липиды – фосфатидилинозит и ганглиозид GM<sub>1</sub> – или конъюгат карбоксилированного олигоглицина с фосфолипидом. Более того, пегилирование липосом с жидкофазной или гелевой мембраной приводит к их быстрому разрушению в сыворотке. Несомненно, полученные результаты актуальны для современных разработок в области наномедицины.

Теоретическая значимость работы заключается в следующем. 1. Показано, что липосомы, несущие на поверхности остатки лекарств, могут стимулировать моноцитарный фагоцитоз, и предложен механизм этого явления, которое опосредовано центральным белком системы комплемента C3. 2. На основании теоретических представлений предложены новые биополимеры для экранирования терапевтических липосом (и, соответственно, увеличения их времени жизни), и экспериментально подтверждена действенность предложенных молекул. 3. Показано, что пегилирование липосом в разных экспериментальных и структурных контекстах может приводить к противоположным эффектам, то есть либо к их стабилизации,

либо быстрому разрушению в плазме крови.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что липосомальный препарат с пролекарством мелфалана и фосфатидилинозитом в качестве стабилизирующего компонента показал значительное преимущество по сравнению с мелфаланом в исследованиях острой токсичности и переносимости на крысах, а также противоопухолевой эффективности на модели рака молочных желез мышей. Выявленная активность липосомального метотрексата делает его потенциальным препаратом для лечения воспалительных заболеваний, в патобиологии которых задействованы моноциты.

Оценка результатов исследования выявила, что достоверность экспериментальных данных не вызывает сомнений, поскольку измерения проводились с использованием сертифицированного оборудования, неоднократно воспроизводились и были правильно статистически обработаны. Выбранные методы исследования адекватны поставленным задачам и соответствуют современному уровню научных исследований.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, в анализе полученных результатов. Все экспериментальные данные получены автором лично за исключением следующих: измерения на проточном цитофлуориметре были выполнены д.б.н. С.В. Хайдуковым (лаборатория углеводов ИБХ РАН), изучение противоопухолевой эффективности липосом с пролекарством мелфалана проведено к.б.н. Е.В. Свирцевской (лаборатория клеточных взаимодействий ИБХ РАН). Автор лично представляла результаты работы на международных конференциях и принимала активное участие в написании и подготовке к публикации научных статей.

На основании вышеизложенного диссертационный совет заключает, что диссертация Третьяковой Д.С. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят вклад в развитие биоорганической химии, биохимии, коллоидной химии и биомедицинской химии, имеют важное значение для развития наномедицины и противоопухолевой химиотерапии. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Третьяковой Дарьи Сергеевны «Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия, соответствует всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650).

На заседании 25 июня 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить

Третьяковой Д.С. ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 02.00.10 - биоорганическая химия, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель  
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

26 июня 2020 г.