

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Третьяковой Дарьи Сергеевны

«Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Диссертационная работа Д.С. Третьяковой посвящена изучению взаимодействия липосомальных композиций, сформированных из природных фосфолипидов, липофильного пролекарства с противоопухолевой активностью и стабилизирующих молекул различной природы, с компонентами плазмы и крови, а также выявлению липосомального состава, обеспечивающего стабильность липосом. Представленная на отзыв работа изложена на 146 страницах машинописного текста и имеет классическую структуру: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, включающий 270 источников, и приложения.

Во введении приводится обоснование актуальности, проведенных автором исследований, которые связаны с разработкой лекарственных средств на основе липосом. Известно, что увеличить биодоступность противоопухолевых средств можно за счет их включения в системы доставки различной природы. Это приводит к увеличению их биологического действия, снижению неблагоприятной общей токсичности, а также позволяет решить проблему лекарственной устойчивости. Липосомальные системы доставки являются объектом пристального изучения и совершенствования, поскольку они построены из природных фосфолипидов и характеризуются хорошей био- и гемосовместимостью. В настоящее время липосомальные противоопухолевые, противогрибковые, обезболивающие препараты коммерчески доступны на рынке. Однако, кажущаяся простота создания липосомальных препаратов, в реальности может обернуться многолетними исследованиями, поскольку при разработке необходимо учитывать многочисленные факторы, такие как строение и свойства включаемого препарата, липидный состав носителя, наличие защитного модуля, стабильность липосом в кровотоке, способ введения препарата и место его целевого действия, а также многие другие факторы. Одной из главных проблем остается формирование целостной картины взаимодействия липосомальных систем с компонентами крови, поскольку при системном введении именно кровь (ее компоненты) является первым физиологическим барьером, с которым сталкиваются липосомы. При этом формируется биомолекулярная корона липосом, которая, зачастую, кардинально меняет их физико-химические параметры, фармакокинетику, биораспределение. Таким образом, актуальность реализованного исследования не вызывает сомнений, поскольку, продолжая исследования в области создания новых липосомальных противоопухолевых препаратов, проводимых в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, диссертационная работа Д.С. Третьяковой решает проблему формирования научных основ целенаправленного создания липосом, содержащих липофильные пролекарства, и сфокусирована на изучении влияния состава липосом, а именно стабилизирующих молекул, на взаимодействие с компонентами плазмы и крови. Исходя из представленных выше рассуждений автор работы обоснованно сформировал основные задачи исследования, которые связаны с взаимодействием липосом с: 1) компонентами системы комплемента, 2) с субпопуляциями лейкоцитов крови человека, 3) с сывороточным

альбумином. Кроме того, была исследована стабильность липосом с пролекарством, несущих различные стабилизирующие молекулы, в сыворотке крови человека.

Литературный обзор соответствует заявленной тематике работы, и его основные разделы тесно связаны с исследованиями, которые проводил диссертант. В литературном обзоре рассмотрены вопросы влияния физико-химических параметров наночастиц на взаимодействие с белками плазмы крови и выявлены закономерности в поведении наночастиц, связанные с изменением их размера, поверхностного потенциала, механизма поглощения клетками. Собрана информация о влиянии полиэтиленгликоля на связывание с белками крови и освещен его иммуногенный эффект, что требует поиска и исследования новых «пространственных стабилизаторов». Также в литературном обзоре приведена исчерпывающая информация об основных компонентах белковой короны, а также об их взаимодействии с липосомами. В заключительном разделе обзора приведена информация о методах исследования белковой короны и о тонкостях постановки эксперимента. Таким образом литературный обзор подготавливает к дальнейшему пониманию собственных результатов автора и позволяет оценить актуальность работы в соответствии с мировым уровнем.

В разделе Материалы и методы описана методология постановки экспериментов, начиная от синтеза липофильного производного метотрексата и получения липосомальных композиций с пролекарствами до изучения взаимодействия липосом с кровью и ее компонентами, а также с лейкоцитами периферической крови. Для определения параметров липосом были выбраны методы динамического лазерного рассеяния и метод анализа траектории наночастиц. Стабильность липосом изучалась с помощью флуоресцентной спектроскопии, используя явление Ферстеровского переноса энергии, а для изучения взаимодействия липосом с альбумином использовался метод ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Кроме того, использовались и другие методы анализа: гель-хроматография, электрофорез, иммуноблоттинг. Следует отметить, что все методы были адекватны поставленным задачам работы, а их использование учитывало все тонкости работы со сложными биологическими объектами. Экспериментальные данные получены в повторяющихся экспериментах, обработаны с помощью статистических методов и являются достоверными.

В главе 4 приведено обсуждение полученных результатов по изучению липосомальных композиций, несущих пролекарства. В работе впервые было показано, что наличие липофильного производного метотрексата в липосомах промотирует их накопление моноцитами крови человека. Связываясь с белками плазмы, липосомы с метотрексатом активируют систему комплемента, действуя как классический, так и альтернативный механизмы. При этом липосомы вызывают фрагментацию белка C3, который является центральным компонентом системы комплемента, а введение в состав липосом экранирующей добавки не оказывает влияния на процесс активации. Выявленная активность липосомального метотрексата делает его потенциальным препаратом для лечения ряда воспалительных заболеваний (артрит, воспалительные заболевания кишечника, хроническая обструктивная болезнь и т.д.), что представляет собой новое практическое применение этого противоопухолевого агента.

Важную фундаментальную и практическую значимость имеют исследования липосом с липофильным производным мелфалана, содержащих различные стабилизирующие молекулы (фосфатидилинозит, ганглиозид GM₁, пептидолипид на основе карбоксилированного олигоглицина). В первую очередь актуальность этих исследований связана с поиском

альтернативы «пэгилированию», на которое развивается иммунный ответ, приводящий к снижению терапевтического действия препарата при его повторном введении. В работе показано, что ганглиозид GM₁ и пептидолипид могут стабилизировать липосомы при инкубации с сывороткой крови в течение 24 ч (с фосфатидилинозитом всего 4 часа), при этом связывание сывороточного альбумина на поверхности липосом не оказывает влияния на структуру липидного бислоя. Отсутствие в составе липосом экранирующих молекул приводит к внедрению альбумина в гидрофобную часть бислоя, что приводит к перестройке конформации белка и образованию его агрегатов. При включении в липосомы базового состава липофильного производного полиэтиленгликоля происходит быстрое разрушение липосом в сыворотке за счет диссоциации комплексных мицелл в водную фазу. Только использование ПЭГ-производного в количестве 10% мольн. стабилизировало липидный бислой композиций, содержащих 30% мольн. холестерина и имеющих жидкокристаллическую упорядоченную фазу. Изучение липосом, содержащих липофильное производное мелфалана, демонстрируют все многообразие факторов, которые в совокупности определяют поведение липосом в кровотоке, и которые должны обязательно учитываться при создании новых систем доставки. Таким образом, проведенные исследования имеют фундаментальную новизну с точки зрения изученного взаимодействия липосом с клетками и белками крови, а также практическую значимость, поскольку полученный липосомальный препарат мелфалана имеет преимущество в эффективности, острой токсичности и переносимости в сравнении с самим мелфаланом.

К представленной на отзыв работе имеется ряд **вопросов и замечаний**.

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 GM₁, 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 фосфатидилинозита 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»?

Высказанные вопросы и замечания, однако, не умаляют ценности полученных в работе новых результатов, имеющих большие перспективы для дальнейшей разработки и применения. Материал диссертация хорошо структурирован, изложен доступным языком с минимальным количеством опечаток.

Д.С. Третьякова выполнила комплексное исследование в области создания новых липосомальных противоопухолевых препаратов и изучения их взаимодействия с

компонентами плазмы и крови. В диссертационной работе представлен значительный по объему, новизне, теоретической и практической значимости материал. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, выводы сформулированы четко и обоснованно, и соответствуют содержанию работы. Материалы диссертационного исследования опубликованы в ведущих иностранных и российских научных журналах. Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

Диссертационная работа Третьяковой Дарьи Сергеевны «Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови» представляет собой законченное исследование, которое по актуальности, теоретической и практической значимости, новизне экспериментального материала и достоверности сделанных выводов отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, согласно пунктам 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, и является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих важное значение для создания новых противоопухолевых препаратов липосомального ряда, имеющих улучшенные характеристики, и развития направления наномедицины в Российской Федерации. Автор работы – Д.С. Третьякова – несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Маслов Михаил Александрович

Специальность – 02.00.10 «Биоорганическая химия»;

119571, г. Москва, проспект Вернадского, д.86;

+7(495)246-05-55, доб. 202;

maslov_m@mirea.ru, mamaslov@mitht.ru;

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "МИРЭА - Российский технологический университет" (РТУ МИРЭА)

<https://www.mirea.ru/>;

Директор Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова,
д.х.н., доцент

М.А. Маслов

05 июня 2020 г.

Подпись М.А. Маслова

«Заверяю»

Первый проректор



Н.И. Прокопов