

## 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**

Массовое увеличение числа пациентов с онкологическими заболеваниями убедительно демонстрирует необходимость поиска новых химиотерапевтических средств и современных стратегий их введения. Применение супрамолекулярных носителей для лекарственных препаратов является одним из подходов к увеличению таргетности и уменьшению токсичности их воздействия. Использование в качестве нанопереносчиков липосомальных матриц, характеризующихся высокой биосовместимостью, может быть затруднено их взаимодействием с компонентами плазмы крови. В частности, опсонизация липосом может приводить к активации системы комплемента. Одним из способов борьбы с возможным развитием гиперчувствительности является введение в состав липосом специальных экранирующих молекул. В связи с этим, диссертация Третьяковой Д.С., посвященная изучению особенностей взаимодействия с компонентами плазмы крови липидных везикул, включающих как липофильные цитотоксические пролекарства, так и молекулы, экранирующие липосомы от опсонинов, представляется чрезвычайно интересной и актуальной.

Диссертация Третьяковой Д.С. изложена на 146 страницах машинописного текста, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 270 наименований, а также двух приложений. Материалы работы были неоднократно представлены в виде устных и стендовых докладов на престижных российских и международных конференциях и симпозиумах. По теме работы опубликовано пять статей в высокорейтинговых профильных журналах. Следует отметить, что во всех работах соискатель является первым автором, что свидетельствует об его определяющем вкладе.

Представленный во введении материал способствует четкому позиционированию цели и обоснованию актуальности работы. Для достижения указанной цели автором формулируются четыре основные задачи.



Глава «Обзор литературы» состоит из четырех подразделов и заключения. Диссертант скрупулезно проанализировал большой массив информации, относящейся к зависимости образования белковой короны от различных характеристик наночастиц, к последствиям сорбции основных компонентов белковой короны на их поверхности и особенностям взаимодействия наночастиц различного состава с клетками крови. Приведенные литературные данные выстроены таким образом, чтобы читатель смог понять логику исследования и дальнейшего изложения материала, а также все методические аспекты работы. В этой связи следует особо упомянуть подраздел, посвященный методам изучения белковой короны. В кратком заключении в конце этой главы автор еще раз обосновывает актуальность исследования.

Глава «Материалы и методы» состоит из двух подразделов. Первый посвящен непосредственно материалам, которые были использованы в диссертационной работе. Второй разделен на тринадцать параграфов и содержит детальную информацию об используемых методах. Следует отметить, что в работе используется богатый набор методических подходов, что позволило автору проанализировать разные аспекты изучаемых явлений и решить все поставленные задачи.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из двух частей. Первая часть посвящена липосомам с липофильным пролекарством метотрексата. Автор достоверно показывает, что введение пролекарства метотрексата увеличивает фагоцитоз липосом моноцитами независимо от наличия тестируемых экранирующих молекул, фосфатидилинозита, ганглиозида GM<sub>1</sub> и пептидолипида SMG-PE. Кроме того, в ходе работы доказана способность липосом с пролекарством активировать систему комплемента посредством как альтернативного, так и классического путей, что, вероятнее всего, обусловлено экспонированием остатков метотрексата на поверхности наночастиц и их реакционной способностью. Вторая часть главы «Результаты и их обсуждение» посвящена изучению липидных везикул, содержащих липофильное пролекарство мелфалана, химиотерапевтического агента с другим механизмом цитотоксического действия, а также взаимодействию нагруженных пролекарством липосом с компонентами плазмы крови, как в присутствии, так и в отсутствие экранирующих молекул. В ходе экспериментов продемонстрировано, что в отличие от первой системы везикулы с пролекарством мелфалана не активируют систему комплемента, что можно связать с погружением мелфалана в полярную область мембраны липосом. Автор обнаружил долговременный (не менее суток) защитный потенциал ганглиозида GM<sub>1</sub> и пептидолипида SMG-PE в отношении дестабилизации белками сыворотки крови



наночастиц с пролекарством мелфалана. Также несомненный интерес представляют полученные автором данные о взаимодействии альбумина с мембранами модифицированных мелфаланом липосом в отсутствие и в присутствии различных экранирующих молекул, а также о зависимости детергентного действия ПЭГ-липидов от агрегатного состояния бислоя.

Главы «Заключение» и «Выводы» резюмируют все полученные результаты и сделанные на их основе выводы. Выводы сформулированы автором четко и обоснованно.

В порядке дискуссии хотелось бы задать автору следующие 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 иммуноблоттингом?

К незначительным упущениям также относятся погрешности представления иллюстративного материала, в частности, не на всех рисунках, относящихся к иммуноблоттингу, отмечены молекулярные массы и названия белков, на рисунке 5А смещены подписи, на рисунке 8, где приведены гистограммы FACS-анализа, не указано, какая популяция клеток обозначена символом Н, на рисунке 10 у некоторых колонок нет доверительных интервалов, в подписи к рисунку 13 отсутствует концентрация



фосфатидилинозита. Не вполне удачными кажутся некоторые словосочетания, достаточно часто используемые автором в тексте диссертации и автореферата, в частности, «противоопухолевые липосомы» (что следовало бы заменить на везикулы, включающие противоопухолевые препараты), «жидкостьность» (в некоторых случаях имеет смысл использовать термин «текучесть»), «уширение каналов воды» и «микротрещины в мембране» (следовало бы говорить о транзистентных гидрофильных порах). Работа практически не содержит опечаток.

В целом, диссертация Третьяковой Дарьи Сергеевны «Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови» представляет собой квалифицированную, хорошо продуманную и фундаментальную работу. Полученные результаты являются оригинальными, а вытекающие из них выводы логичными и значимыми. Автореферат полностью отражает суть диссертационной работы. Перечисленные выше замечания не умаляют значимости полученных результатов и сделанных на их основе выводов. В связи с этим считаю, что диссертационная работа Третьяковой Дарьи Сергеевны «Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови» соответствует критериям и 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), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

05 июня 2020 г.

Остроумова Ольга Сергеевна

доктор биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология»,

доцент по специальности «Молекулярная биология»,

заместитель директора по научной работе,

зав. лабораторией моделирования мембран и ионных каналов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4

Тел. +7(911)945-69-53, +7(812)297-24-60

e-mail: [osostroumova@mail.ru](mailto:osostroumova@mail.ru), [ostroumova@incras.ru](mailto:ostroumova@incras.ru)

