

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Государственный научный центр Российской
Федерации

**ИНСТИТУТ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ**

Российской академии наук

(ГНЦ РФ-ИМБП РАН)

ИНН/КПП 7714038980/771401001

ОГРН 1027739333710

Хорошевское шоссе, д. 76А, г. Москва, 123007

телефон: (499) 195-15-73,

факс: (499) 195-22-53

e-mail: doc@imbp.ru

<http://www.imbp.ru>

УТВЕРЖДАЮ

Директор

Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра
Российской Федерации Институт
медико-биологических проблем
Российской академии наук, д.м.н.,
академик РАН

Орлов О.И.

« 05 »

2026 г.



№ 109/
На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра Российской Федерации «Институт
медико-биологических проблем РАН»**

на диссертацию **Гилевой Анастасии Михайловны** «Наноносители для
доставки биомакромолекул и противоопухолевых лекарств: получение и изучение
в 3D модели *in vitro*», представленную на соискание учёной степени кандидата
химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология

Актуальность темы диссертации

Создание систем направленной доставки противоопухолевых препаратов с
использованием наноносителей — одно из активно развивающихся направлений
современной медицинской биотехнологии. Традиционная химиотерапия
сопряжена с рядом серьёзных ограничений: многие цитостатические препараты
характеризуются низкой растворимостью в воде, высокой системной
токсичностью и недостаточной селективностью по отношению к опухолевым
клеткам, что становится причиной тяжёлых побочных эффектов. Применение

наночесителей, способных инкапсулировать лекарственное вещество и обеспечивать его адресную доставку в опухолевую ткань с пролонгированным высвобождением, открывает возможности для повышения терапевтической эффективности и снижения нежелательных эффектов лечения.

Рынок систем доставки противоопухолевых препаратов демонстрирует устойчивый рост. Тем не менее, наночесители, уже применяемые в клинической практике, обладают рядом существенных ограничений — низкой стабильностью, экономической или технологической неэффективностью масштабного производства, а также недостаточной универсальностью в отношении различных типов опухолей. В связи с этим разработка новых, более совершенных систем доставки остаётся актуальной задачей.

Не менее важной проблемой является адекватное тестирование разработанных наночесителей. Традиционные монослойные культуры клеток (2D модели *in vitro*), широко используемые для оценки цитотоксичности, не позволяют корректно воспроизвести структурно-функциональные характеристики солидных опухолей *in vivo*: в 2D условиях нарушаются межклеточные контакты и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, изменяются тканеспецифические функции и профили экспрессии генов. В связи с этим всё большую актуальность приобретают 3D модели *in vitro*, в частности, основанные на мультиклеточных опухолевых сфероидах, которые более точно имитируют микроструктуру опухолевой ткани. Использование таких моделей способно оптимизировать и удешевить предклинические испытания, существенно сократив финансовые и временные затраты на вывод нового препарата на фармацевтический рынок.

Таким образом, разработка новых наночесителей для направленной доставки противоопухолевых препаратов и их всестороннее тестирование с применением современных 3D моделей *in vitro* является актуальной задачей. Именно решению этой задачи посвящена работа Гилевой А.М. Актуальность диссертации не вызывает сомнений.

Содержание диссертации

Работа Гилевой А.М. изложена на 180 страницах и включает 88 рисунков и 32 таблицы. Работа имеет стандартную структуру и содержит разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы, Приложение. Список цитируемой литературы включает 274 источника.

Обзор литературы занимает 55 страниц и посвящён детальному анализу существующих на сегодняшний день подходов к лечению онкологических заболеваний и использованию наночесителей противоопухолевых препаратов как одного из наиболее перспективных способов терапии рака. Подробно рассмотрена классификация наночесителей по их природе (полимерные, липидные,

неорганические) с акцентом на преимуществах и недостатках каждого типа, а также представлены актуальные результаты об успешном прохождении различными наночастицами клинических испытаний. Особое внимание уделено различным стратегиям модификации наночастиц, в том числе увеличению стабильности с помощью защитных полимеров, созданию систем с контролируемым высвобождением (pH-чувствительные, термочувствительные, магнитные наночастицы) и таргетной доставке с использованием низкомолекулярных, пептидных, белковых, нуклеотидных и углеводных лигандов.

Во второй части обзора обоснованно ставится вопрос о том, что создание нового наночастицы является лишь первым этапом разработки — не менее важным представляется выбор адекватной модели для оценки его биологической активности и терапевтического потенциала. Классический подход «2D модель *in vitro* + испытания *in vivo*» неэффективен, так как монослойная культура клеток не позволяет адекватно имитировать солидную опухоль *in vivo*, в результате чего данные таких исследований часто оказываются некорректными, что усложняет и замедляет процесс тестирования. В связи с этим в обзоре сделан акцент на промежуточном этапе исследования: «2D модель *in vitro* + 3D модель *in vitro* (опухолевые сфероиды) + переход к испытаниям *in vivo*». Рассмотрены наиболее популярные методы создания 3D моделей *in vitro* (метод висюльки капли, суспензионное культивирование, культивирование в матриксах, спонтанная самоагрегация, индуцируемая RGD-пептидом самосборка клеток), их достоинства и недостатки. Таким образом, обзор литературы достаточно полно описывает текущие задачи в области разработки и тестирования наночастиц для противоопухолевой терапии и подводит к цели и задачам диссертации. Обширный список литературы (274 источника) подтверждает широкий научный кругозор автора и умение работать с литературой.

В главе «Материалы и методы» в полной мере представлены все используемые в работе реактивы и протоколы исследований.

В главе «Результаты и их обсуждение» подробно и логично описаны результаты работы. В первом разделе обосновывается выбор клеточных линий (раковых и нормальных) и описываются преимущества выбранного автором способа получения опухолевых сфероидов методом индуцированной самосборки клеток под действием циклического RGD-пептида. Далее описаны результаты тестирования пяти новых наночастиц: трёх липидной природы (ПЭГилированные липосомы и липоплексы на основе катионных липопептидов, керасомы с пролонгированным высвобождением доксорубина, фолат-конъюгированные катионные липосомы) и двух полимерных (полиэлектролитные наноконтейнеры на основе природных полисахаридов, полиэлектролитные мультислойные капсулы, модифицированные лигандом DR5-B).

Для каждого типа наночастицы представлены данные по получению и физико-химической характеристике (размер, зета-потенциал, морфология,

эффективность загрузки), исследованию накопления в клетках (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, проточная цитофлуориметрия), а также цитотоксичности (MTT-тест) в 2D и 3D моделях *in vitro*. Важно отметить, что каждый тип наноносителя протестирован как в 2D, так и в 3D моделях, что наглядно демонстрирует различия в результатах, получаемых с использованием этих моделей. Рассмотрение каждого наноносителя завершается разделом «Заключение» с краткой сводкой полученных результатов и перспектив дальнейшего исследования, что удобно для читателя и позволяет систематизировать информацию. Все результаты хорошо проанализированы, грамотно интерпретированы и обсуждены с привлечением аналогичных данных из литературы. Таким образом, материал, изложенный в данной главе, полностью отражает ход проделанной Гилевой А.М. работы.

Научная новизна

В диссертации разработана и исследована серия оригинальных наноносителей для направленной доставки противоопухолевых препаратов, охватывающая как липидные, так и полимерные системы. К первой группе относятся катионные липосомы на основе новых липопептидов — производных аминокислот орнитина, глутаминовой и аспарагиновой кислот с длинноцепочечными алкильными радикалами ($\text{OrnGlu}(\text{C}_{16}\text{H}_{33})_2$, $\text{OrnOrnGlu}(\text{C}_{16}\text{H}_{33})_2$, $(\text{Orn})_2\text{OrnGlu}(\text{C}_{16}\text{H}_{33})_2$, $\text{OrnAsp}(\text{C}_{10}\text{H}_{21})_2$ и др.). Ко второй — полимерные наноконтейнеры и капсулы на основе природных биоразлагаемых полисахаридов и поликатионов (хитозан, ДЭАЭ-декстран, ксантановая камедь, сульфат декстрана, поли-L-аргинин). Автором впервые получены и охарактеризованы следующие системы:

- катионные липоплексы, содержащие модельную мРНК или плазмидную ДНК, модифицированные новыми производными полиэтиленгликоля (ПЭГ);
- нейтральные и катионные керасомы с пролонгированным высвобождением доксорубина (DOX);
- катионные липосомы, поверхность которых пост-модифицирована лигандами фолиевой кислоты, с загрузкой DOX;
- полиэлектролитные наноконтейнеры состава хитозан / ксантановая камедь или ДЭАЭ-декстран / ксантановая камедь, загруженные тимохиноном (TQ) и модифицированные ПЭГ или поли-L-лизином;
- полиэлектролитные мультислойные капсулы состава $(\text{PArg}/\text{DS})_3$, модифицированные лигандом DR5-B и загруженные DOX в субтоксичной концентрации, обладающие синергетическим цитотоксическим эффектом.

Особо следует отметить, что все разработанные наноносители впервые протестированы в 3D моделях *in vitro* на основе мультиклеточных опухолевых сфероидов, сформированных методом индуцированной самосборки клеток под

действием циклического RGD-пептида, разработанным ранее в ИБХ РАН. Цитотоксичность наноносителей оценена с использованием 10 линий раковых и нормальных клеток, а также проведён систематический сравнительный анализ результатов, полученных в 2D и 3D моделях *in vitro*. Таким образом, научная новизна работы Гилевой А.М. очевидна.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты, полученные Гилевой А.М., вносят существенный вклад в понимание взаимосвязи между составом, структурой и биологическим поведением наноносителей различной природы — липидной и полимерной. Продемонстрированное в работе систематическое сравнение эффективности наноносителей в 2D и 3D моделях *in vitro* расширяет фундаментальные представления о том, в какой степени архитектура клеточного окружения влияет на цитотоксичность, накопление и селективность систем доставки противоопухолевых препаратов.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанные наноносители — керасомы с пролонгированным высвобождением доксорубина, фолат-конъюгированные липосомы, полисахаридные наноконтейнеры с тимохиноном, а также мультислойные капсулы с лигандом DR5-B — могут послужить основой для создания новых эффективных терапевтических систем, в том числе для таргетной терапии онкологических заболеваний. Кроме того, применённый в работе подход к тестированию наноносителей с использованием мультиклеточных опухолевых сфероидов, формируемых методом индуцированной RGD-пептидом самосборки клеток, может быть рекомендован в качестве удобной и воспроизводимой 3D модели для скрининга других перспективных наноносителей на предклиническом этапе разработки.

Таким образом, теоретическая ценность и практическая значимость работы не вызывают сомнений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Диссертация Гилевой А.М. отличается хорошей логикой с момента формулирования цели и задач до обсуждения полученных результатов и сделанных из них выводов. Все наноносители охарактеризованы с использованием современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования, в том числе таких, как динамическое светорассеяние, измерение дзета-потенциала, флуоресцентная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, проточная цитофлуориметрия, МТТ-анализ, а также методов статистической обработки данных. Сходимость и согласованность результатов, полученных различными методами, а также воспроизводимость данных в серии экспериментов свидетельствуют о достоверности представленных выводов.

Результаты работы были опубликованы в 17 печатных работах, из которых 16 статей в журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Scopus и/или Web of Science, в том числе в таких журналах, как ACS Applied Materials & Interfaces (Q1, IF 9,23), Materials Science and Engineering C (Q1, IF 8,32), Pharmaceutics (Q1, IF 6,29), Nanomaterials (Q2, IF 5,44), International Journal of Molecular Sciences (Q1, IF 4,91), Journal of Biomedical Materials Research Part B (Q2, IF 3,43), Journal of Microencapsulation (Q2, IF 3,35) и др. Основные результаты работы были представлены в виде 41 постерного и устного доклада на следующих конференциях: 23rd, 24th и 26th International Conference on Bioencapsulation (2015 г., Делфт; 2016 г., Лиссабон; 2019 г., Страсбург), 6th–11th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent advances safety-toxicology and ecology issues» (2015–2019 и 2021 гг., Крит), 33rd Conference of the European Colloid and Interface Society (2019 г., Левин), EUPOC 2018 (2018 г., Комо), 10th Microencapsulation Training School (2018 г., Тронхейм), а также на многочисленных российских и международных конференциях и школах молодых учёных (2014–2025 гг.).

При знакомстве с работой возникли несколько вопросов и замечаний:

1. В работе использованы десять линий клеток, в том числе не только опухолевые (например, MCF-7, U-87MG, C6 и другие), но и нормальные (например, MSC и Bj-5TA). Чем обусловлен выбор этих клеточных линий?
2. В работе были изучены катионные липосомы, в которые в качестве лиганда встроена фолиевая кислота для таргетной доставки в опухолевые клетки. Чем обоснован выбор именно этих четырёх клеточных линий (C6, U-87MG, MSC, MCF-7) для тестирования цитотоксичности полученных фолат-конъюгированных липосом в 3D моделях?
3. Для тестирования наноносителей автор использует 3D модели *in vitro*, полученные методом самосборки клеток, индуцируемой циклическим RGD-пептидом. В чём преимущества данного метода по сравнению с классическими подходами (например, методом висячей капли или суспензионным культивированием в спиннерах)?

Перечисленные вопросы не снижают научную ценность диссертации Гилевой А.М.

Заключение

Диссертационная работа Гилевой Анастасии Михайловны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении учёных 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 № 1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Отзыв заслушан и одобрен на Учёном совете ГНЦ РФ-ИМБП РАН (протокол № 7 от 23 сентября 2026 г).

Отзыв подготовили:

Ведущий научный сотрудник
лаборатории физиологии
иммунной системы, доктор
медицинских наук

Рыкова Марина Петровна

Старший научный сотрудник
лаборатории клеточной
физиологии, кандидат
медицинских наук

Маркина Елена Александровна

Подписи удостоверяю:

Учёный секретарь ГНЦ РФ-
ИМБП РАН, д.б.н.



М.А. Левинских

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (ФГБНУ ГНЦ РФ-ИМБП РАН)

Адрес: 123007, г. Москва, Хорошёвское ш., д. 76А

Телефон.: +7 (499) 195-15-00; электронная почта: info@imbp.ru