ОТЗЫВ
официального оппонента

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

Лечение онкологических заболеваний остаётся одной из ключевых проблем современной медицины. Стандартная химиотерапия характеризуется низкой селективностью: терапевтические дозы нередко вызывают серьёзные побочные эффекты, что существенно ограничивает клиническую применимость данного подхода. В этом контексте разработка новых эффективных наноразмерных систем доставки, способных инкапсулировать лекарственный препарат и тем самым снижать его цитотоксичность в отношении здоровых клеток, рассматривается как одно из наиболее перспективных решений. В то же время наноносители, уже нашедшие применение в клинической практике (например, липосомальный доксорубицин), обладают рядом ограничений, что определяет потребность в разработке новых, более эффективных и технологичных систем доставки, а также в совершенствовании подходов к их доклинической оценке.

Так, отдельного внимания заслуживает проблема тестирования наноносителей на предклиническом этапе. Поскольку повсеместно применяемые монослойные культуры клеток (2D модели *in vitro*) не воспроизводят ключевые характеристики солидных опухолей, результаты цитотоксичности, полученные в 2D-условиях, нередко расходятся с данными *in vivo*, что приводит к неоправданным затратам на проведение доклинических испытаний. Внедрение в исследовательскую практику 3D моделей *in vitro* позволяет более адекватно моделировать микроструктуру опухолевой ткани и тем самым повысить прогностическую ценность *in vitro* тестирования.

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

Содержание диссертации

Диссертация Гилевой А.М. изложена на 180 страницах, содержит 88 рисунков и 32 таблицы. Работа включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, приложение. Библиографический список охватывает 274 источника.

Глава «Обзор литературы» представляет собой глубокий и системный анализ современного состояния исследований в области создания наноносителей для противоопухолевой терапии. Автором последовательно рассмотрены основные подходы к

лечению онкологических заболеваний, сформулирована концепция направленной доставки лекарств и изложены ключевые требования, предъявляемые к наноносителям. Подробно описана классификация систем доставки по типу материала-носителя (липидные, полимерные и неорганические). Значительное внимание уделено стратегиям функционализации поверхности наноносителей, включая повышение стабильности за счёт защитных полимеров, создание стимул-чувствительных систем с контролируемым высвобождением и модификацию лигандами различной природы. Кроме того, в обзоре представлены данные о наноносителях, успешно прошедших предклинические и клинические испытания, что придаёт работе прикладной контекст. В заключительной части обзора литературы автором подробно рассмотрены различные методы создания 3D моделей *in vitro*: висячая капля, суспензионное культивирование, культивирование в матриксах, спонтанная самоагрегация и индуцируемая RGD-пептидом самосборка клеток. Обзор хорошо структурирован, грамотно написан и полностью коррелирует с целью и задачами работы. Хочется особо отметить высокое качество рисунков, представленных в работы.

Глава «Материалы и методы» содержит детальное описание всех использованных реактивов, клеточных линий и экспериментальных протоколов.

Глава «Результаты и их обсуждение» организована последовательно и охватывает пять типов наноносителей липидной (№1-3) и полимерной (№4-5) природы с различными модификациями:

1) ПЭГилированные липосомы и липоплексы на основе катионных липопептидов: изучено влияние структуры липопептида (2–4 катионные группы) на размер, цитотоксичность и трансфекционную активность; ПЭГилирование проведено тремя новыми производными ПЭГ.
2) Керасомы – гибридные липидно-неорганические наноносители с пролонгированным высвобождением доксорубицина и стабильностью до 120 дней.
3) Фолат-конъюгированные катионные липосомы, полученные методом пост-модификации: продемонстрирована селективность накопления в клетках с высокой экспрессией фолатных рецепторов (MCF-7, C6) по сравнению с клетками с низкой экспрессией (U-87MG, MSC).
4) Полиэлектролитные наноконтейнеры на основе природных полисахаридов (хитозан или ДЭАЭ-декстран / ксантановая камедь), загруженные тимохиноном и модифицированные ПЭГ или поли-L-лизином: установлено, что размер и заряд наноконтейнеров определяют эффективность их накопления и цитотоксичность.
5) Полиэлектролитные мультислойные капсулы состава полиаргинин/сульфат декстрана, модифицированные рекомбинантным лигандом DR5-B и загруженные доксорубицином в субтоксичной концентрации: продемонстрирован синергетический цитотоксический эффект, позволивший преодолеть резистентность клеток MCF-7 к DR5-B-терапии, а также подтверждена безопасность капсул для нормальных клеток Bj-5ta.

Принципиально важно, что каждый тип наноносителя был протестирован автором как в монослойной культуре (2D), так и в сфероидах (3D). Продемонстрированные в работе выраженные различия биологического поведения (цитотоксичность, эффективность накопления в клетках) наноносителей в 2D и 3D моделях *in vitro* дополнительно обосновывают необходимость трёхмерного тестирования и подчёркивают значимость проведённых

исследований. Все результаты тщательно проанализированы и обсуждены, опираясь на литературные данные. Таким образом, материал главы полно и последовательно отражает ход исследования.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость

Научная новизна работы заключается в комплексном подходе к разработке и оценке наноносителей для противоопухолевой терапии: автором впервые получены, охарактеризованы и протестированы в 2D и 3D моделях *in vitro* пять новых наноносителей для противоопухолевой терапии. Важно подчеркнуть, что их цитотоксичность оценена с использованием 10 линий раковых и нормальных клеток, а также проведён сравнительный анализ результатов, полученных в 2D и 3D моделях. Таким образом, научная новизна работы очевидна.

Полученные результаты позволяют расширить фундаментальные знания как в области дизайна наноносителей для доставки лекарств, так и в части их тестирования с применением новых 3D моделей in vitro. Практическая значимость состоит в том, что разработанные наноносители могут послужить основой для создания новых терапевтических систем таргетной терапии онкологических заболеваний, а применённый подход к 3D-тестированию может быть рекомендован в качестве воспроизводимой платформы для скрининга перспективных систем доставки на доклиническом этапе. Таким образом, теоретическая ценность и практическая значимость работы не вызывают сомнений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов

Диссертация Гилевой А.М. представляет собой комплексное экспериментальное исследование, выстроенное логично и последовательно. В работе автор использует современные физико-химические и молекулярно-биологические методы: проточную цитофлуориметрию, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию, МТТ-тест, новый метод RGD-индуцированной самосборки клеток для формирования мультиклеточных сфероидов, а также методы статистической обработки данных. Достоверность результатов подтверждается их сходимостью и согласованностью.

Результаты работы Гилевой А.М. опубликованы в 17 статьях (из них 5 — в журналах категории Q1, 6 — категории Q2, суммарный IF 61.49) в журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Scopus и/или Web of Science, а также были представлены на 41 российской и международной конференции в виде устных и постерных докладов.

К работе имеется ряд замечаний:

1. С.23. Рисунок 7 – Классификация систем доставки на основе липидов в зависимости от их размера и количества слоев. Было бы полезно по осям отложить значения числа слоев и размер везикул;

2. С.40. Автор пишет: "При этом несколько неорганических наночастиц (Feridex IV, Endorem, Resovist, Rienso, Gastromark и др), в основном представляющих из себя агенты для диагностики, уже попало на фармацевтический рынок." Хочется добавить, что в конце 2025 г. FDA одобрило препарат на основе наночастиц оксида железа для МРТ контрастирования опухоли мозга с коммерческим названием Ferabright, в котором используются такие же частицы, как и в препарате Feraheme - одобренным FDA в 2009 году в качестве средства борьбы с анимией в виде внутривенных инъекций;

3. С.90 Таблица 11 – Средний размер и ζ-потенциал липосом и липоплексов, загруженных плазмидой pGL3 или миРНК. Значения дзета потенциала приведены с излишней точностью, с учетом значений абсолютной погрешности стоит округлить до десятых значений, аналогичное замечание по таблице 13 (С.94); Это же замечание можно применить к Таблице 12 – Значения IC50 для липосом после 24 ч инкубации с клетками HeLa и HEK293T (2D модель in vitro). Результаты МТТ–теста. Значения стоит округлить до целых значений с учетом значений абсолютной погрешности;

4. Известно, что молекулярная масса ПЭГ влияет на время циркуляции частиц. ПЭГ какой молекулярной массы использовался в работе и чем обусловлен выбор?

Заключение

Перечисленные замечания не снижают научной значимости диссертации Гилевой А.М. и в большинстве своём носят рекомендательный характер. Работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. По всем критериям, в том числе актуальности поставленной задачи, а также новизне и значимости полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям (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.

Официальный оппонент, профессор Центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», доктор химических наук

_____ / Горин Дмитрий Александрович /

121205, Москва, Большой бульвар, д. 30, стр. 1
Тел.: +7 (495) 280-18-81 (доб. 3588)
E-mail: d.gorin@skoltech.ru

РУКОВОДИТЕЛЬ ОТДЕЛА
КАДРОВОГО АДМИНИСТРИРОВАНИЯ
Гук О.С.
13.10.26

Skoltech