

«УТВЕРЖДАЮ»



Первый проректор
ФГБОУ ВО "Московский технологический
университет"

В.Л. Панков

2018 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский технологический университет"

на диссертацию **Алексеевой Анны Сергеевны**

«Механизмы взаимодействия с клетками противоопухолевых липосом с липофильными пролекарствами»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в мире. Многие из противоопухолевых химиотерапевтических препаратов, успешно используемые в клинической практике, обладают рядом побочных эффектов, которые негативно сказываются на здоровье пациентов. Эффективная доставка противоопухолевых лекарственных средств, способных селективно (направленно) действовать на больные органы и ткани, является фундаментальной проблемой биоорганической и медицинской химии. Использование адресных наноразмерных систем доставки лекарств представляется одним из наиболее рациональных подходов к решению этой проблемы, особенно в области онкологии, где применяются химиотерапевтические препараты с высоким уровнем системной токсичности. Каждый год сообщается о разработке новых липосомальных форм противоопухолевых лекарств. Включение водорастворимых лекарств во внутренний объем липосом имеет свои ограничения, поэтому альтернативным способом загрузки липосом является встраивание в липидный бислой липофильных пролекарств, которые эффективно высвобождаются из липидного окружения в организме, трансформируются в активные терапевтические формы.

Диссертационная работа А.С. Алексеевой является логическим продолжением исследований по созданию и установлению механизмов действия липосом, несущих липофильные производные широко используемых в клинике противоопухолевых препаратов: алкилирующего агента – мелфалана, и антиметаболита фолиевой кислоты – метотрексата. Терапевтическая эффективность липосомальных препаратов с липофильными пролекарствами ранее подтверждена в экспериментах *in vivo* на моделях опухолей мышей. Однако их внутриклеточный транспорт ранее не изучался. А ведь именно он играет важнейшую роль в реализации специфического действия лекарства на клеточном уровне. Поэтому целью диссертационной работы А.С. Алексеевой стало исследование механизмов взаимодействия с клетками и внутриклеточного транспорта липосом с липофильными пролекарствами мелфалана и метотрексата с помощью флуоресцентных методов.

Актуальность работы не вызывает сомнений, поскольку детальное изучение внутриклеточного транспорта липосомальных форм липофильных пролекарств, механизмов проникновения в клетку и процессов высвобождения активного агента является необходимым этапом не только создания новых медицинских препаратов, но и выявления фундаментальных закономерностей взаимодействия наноразмерных частиц с эукариотическими клетками.

Диссертация А.С. Алексеевой объемом 105 страниц представлена в традиционном виде и состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, описания материалов и методов исследования, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 178 ссылок, и одного приложения. Работа иллюстрирована 22 рисунками и содержит 3 таблицы.

Во «Введении» автор дает общую справку об актуальности исследования, ставит цель предстоящей работы, приводит список задач предстоящего исследования и основные результаты.

Обзор литературы посвящен вопросам направленного транспорта наноразмерных систем доставки лекарств, позволяющих селективно воздействовать на очаги патологии при системном введении в организм. При этом особое внимание уделяется липосомальным системам доставки лекарств, их активному и пассивному нацеливанию на клетки-мишени. Отдельная часть обзора литературы посвящена рассмотрению процесса эндоцитоза наночастиц и влиянию физико-химических параметров наночастиц (размер, форма, модификация поверхности) на процесс их проникновения во внутреннее пространство клеток.

Глава «Результаты и обсуждение» является логическим изложением и анализом экспериментальных данных, хорошо проиллюстрирована рисунками и таблицами. Разбиение данной главы на два раздела обосновано решением двух основных задач по: 1) изучению взаимодействия липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана и декорированных SiaLe^X-лигандом с эндотелиальными клетками сосудов крови; 2) изучению механизмов взаимодействия липосом, нагруженных липофильным пролекарством метотрексата, с опухолевыми клетками.

Методологические трудности и скудность молекулярных инструментов, соответствующих изучаемому объекту, ограничивают возможности исследования механизмов взаимодействия липосом с клетками. **Научная новизна** данной работы состоит в синтезе нового зонда - флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата, несущего BODIPY-метку на концевой метильной группе насыщенной алифатической цепи, и изучении механизмов взаимодействия липосом с флуоресцентно-меченым липофильным пролекарством метотрексата с опухолевыми клетками.

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в получении новых данных о взаимодействии с опухолевыми клетками липосом с липофильным производным метотрексата. Показано, что при переходе к супрамолекулярной липосомальной системе изменяется механизм проникновения в клетку пролекарства метотрексата, по сравнению с метотрексатом как таковым. Для липофильного метотрексата предложен рецепторно-опосредованный механизм проникновения липосом, в котором не задействованы ни фолатный рецептор, ни транспортер восстановленных фолатов. Также показано, что механизмы взаимодействия клеток-мишеней с липосомами, содержащими липофильные пролекарства, зависят от структуры лекарства, наличия на поверхности липосом адресных лигандов и типа клеток.

Использование селективов как мишеней для доставки липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана и декорированных SiaLe^X-лигандом, является перспективным подходом для ингибирования роста опухоли, который не зависит от ряда анатомических барьеров (слои периваскулярных, гладкомышечных клеток и фибробластов, разделяющие эндотелиальные клетки и опухоль) и повышенного внутритканевого давления в опухоли. Селективность SiaLe^X-липосом, нагруженных цитостатическим препаратом, в отношении активированных эндотелиальных клеток, а также установление детального механизма проникновения липосом и высвобождения пролекарства определяет **практическую ценность** работы. Кроме того, автором предложен и адаптирован ряд удобных методов, которые могут быть использованы для исследования процессов взаимодействия наноразмерных частиц с эукариотическими клетками.

В работе был использован целый ряд флуоресцентных методов. Экспериментальные данные были получены как с помощью конфокальной микроскопии, так и проточной цитометрии, и флуоресцентной спектроскопии. При этом вся совокупность методов была адаптирована под работу с наноразмерными носителями — липосомами. Использование спектрофлуориметрии позволило получить количественные данные о накоплении липосом в активированных клетках HUVEC (15 000 SiaLe^X-липосом на одну клетку за один час инкубации). Следует отметить оригинальность постановки методики эксперимента для изучения рецептор-опосредованной доставки липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана и декорированных SiaLe^X-лигандом, к рецепторам E-селектина активированных клеток HUVEC.

Исследования по теме диссертации выполнены на высоком научном уровне с использованием современных подходов к синтезу флуоресцентно-меченного липофильного производного метотрексата, физико-химических (гель- и адсорбционные хроматографии, УФ-спектроскопия, флуориметрия, лазерное динамическое светорассеяние и др.) и биологических методов (культивирование эукариотических клеток, иммуноокрашивание, селективное ингибирование) исследования, цель работы достигнута, поставленные задачи решены. Достоверность и обоснованность результатов не вызывает сомнений, автором проведен анализ большого массива экспериментального материала, которые подкреплены данными из современных литературных источников.

Выводы, сформулированные в диссертации, теоретически обоснованы и подтверждены экспериментально. Все результаты получены А.С. Алексеевой самостоятельно.

Результаты, полученные диссертантом, могут быть использованы в Московском технологическом университете, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Медико-генетическом научном центре РАМН, Институте биомедицинской химии им. Ореховича, Институте биологии гена РАН.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в трех статьях в научных журналах, входящих в Перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций, а также доложены на восьми международных научных конференциях. Публикации отражают результаты исследования, изложенные в диссертационной работе. Автореферат дает полное представление о структуре проведенного исследования и его результатах.

По диссертации имеется несколько вопросов и замечаний, которые относятся, главным образом, к изложению и представлению результатов исследований.

1. Не приведены значения поверхностного потенциала для липосом с различным количеством SiaLe^X-лигандов (стр. 38). Не указаны причины 2-кратного снижения индекса полидисперсности для липосом после инкубации с культуральной средой.
2. Не указана причина, по которой изучение взаимодействия липосом, нагруженных липофильным производным метотрексата, проводили на клетках, культивируемых на среде со стандартной концентрацией фолиевой кислоты, а не на фолат-дефицитной среде.
3. Рисунок 11 следовало представить в виде таблицы с процентным содержанием интернализированных липосом (ИЛ) и липосом, связанных с мембранной клеткой (СЛ), а не в виде столбчатых диаграмм.
4. В тексте присутствуют неудачные формулировки, например, «изучения влияния введения SiaLe^X-лиганда ... на взаимодействие...»; "концевой метилен" следует заменить на "концевую метильную группу" (стр. 59, 66). Олигосахарид SiaLe^X

именуется «конъюгатом», «вектором» и «лигандом», что затрудняет восприятие результатов.

5. Подпись к рисунку 12 не содержит расшифровки сокращения «Trf» (стр. 49). На схеме 1 для соединения V не указан «хлоргидрат» (стр. 68).
6. В тексте диссертации содержится некоторое количество опечаток (например, стр. 34, 35, 39, 49, и др.).

Приведенные замечания не снижают общего высокого уровня исследования, не влияют на теоретические и практические результаты диссертации и не изменяют исключительно положительного впечатления от работы.

Диссертационная работа Анны Сергеевны Алексеевой «Механизмы взаимодействия с клетками противоопухолевых липосом с липофильными пролекарствами» представляет собой законченное исследование, выполненное на высоком уровне, и содержит решение вопросов, связанных с разработкой новых наноразмерных форм лекарственных препаратов метотрексата и мелфалана. Диссертационная работа полностью соответствует паспорту специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» п.п. 2, 5. Работа соответствует критериям, установленным п. 9 "Положения 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 автор заслуживает присвоения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Отзыв на диссертацию А.С. Алексеевой обсужден и утвержден на заседании кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского, Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Московского технологического университета (протокол № 9 от 11 апреля 2018 г.)

Научный сотрудник
кафедры химии и технологии биологически
активных соединений, медицинской и органической
химии имени Н.А.Преображенского,
Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова,
Московского технологического университета, к.х.н.
Тел. +7 (926) 657-60-56
e-mail: elena_shmendel@mail.ru

Е.В. Шмендель

Заведующий кафедрой
химии и технологии биологически
активных соединений, медицинской и органической
химии имени Н.А. Преображенского,
Московского технологического университета, д.х.н.
Тел. +7 (495) 246-05-55
e-mail: michael_grin@mail.ru

М.А. Грин

Сведения об организации
ФГБОУ ВО «Московский технологический университет»,
Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова
119571, Москва, просп. Вернадского, д. 86,
Сайт: <https://chemtech.mirea.ru/>