

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу **Кашириной Елены Игоревны** по теме:
«Разработка системы гипоаллергенной упаковки белков в полимерный матрикс», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы выполненной работы

Аллергия I типа характеризуется формированием антител E класса к безвредным объектам, попадающим в организм из окружающей среды, и является в наше время одним из наиболее широко распространенных заболеваний. Проведение патогенетической терапии связано с риском, т.к. введение даже низких доз аллергенов связано с развитием опосредованной IgE реакцией, которая может достигать в некоторых случаях уровня анафилактического шока. Для здравоохранения актуальной является задача разработки новых лекарственных средств для аллерген-специфической терапии, в которых предотвращено перекрестное связывание вакцин с IgE-антителами во избежание риска развития побочных реакций. Уменьшить риск и повысить эффективность можно, в том числе, за счет изменения поверхностной структуры аллергенов, что может быть достигнуто различными способами. В данной работе используется способ экранирования аллергенов за счет их покрытия слоем полимеров. Препараты, в которых аллергены не доступны для IgE антител, значительно более безопасны и могут использоваться в дозах, многократно превышающих дозы для стандартных экстрактов аллергенов, что, в свою очередь, значительно сокращает время проведения терапии и увеличивает ее эффективность.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования по созданию вакцин на основе различного типа хитозансодержащих полимерных матриц.

Хитозан – природный биосовместимый и биоразлагаемый аминополисахарид, обладающий биологической, в том числе, адъювантной активностью. В работе также используется другой природный полимер – альгинат натрия, обладающий перечисленными достоинствами хитозана и образующий с ним нерастворимые в воде полиэлектролитные комплексы. Совместное применение хитозана и альгината позволяет формировать материалы различной физической формы, сочетающие свойства обоих полисахаридов. В этой связи актуальность диссертационной работы Кашириной Е.И., направленная на разработку способа получения безопасных противоаллергических вакцин на основе производных хитозана и альгината натрия, не вызывает сомнений.

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы (245 наименований) и списка сокращений. Работа изложена на 149 страницах, иллюстрирована 41 рисунком и 7 таблицами.

Работа предваряется развернутым литературным обзором (Глава 1), в котором кратко освещены сведения об аллергии, механизмах её возникновения и терапии, особое внимание уделено описанию различных свойств биологических полимеров, в частности хитозана и альгината, методов получения частиц из данных полимеров и их производных, а также нано- и микрочастиц со структурой «ядро-оболочка» путем комплексообразования полимеров.

В методическом разделе (Глава 2) описаны использованные методы исследования химического строения хитозана, структуры и морфологии полученных из полимеров частиц, исследования физико-химических, механических свойств, методы изучения биосовместимости разработанных материалов, исследования *in vivo* противоаллергической активности полученных препаратов, гистологические исследования, *in vitro* исследования биodeградируемости и проникновения в клетки макрофагальной линии.

Основная задача исследования, определяющая его практическую значимость, - повышение эффективности и безопасности АСИТ аллергических заболеваний, была решена в диссертационной работе путем разработки эффективных капсулированных формы аллергенов.

Каширина Е.И грамотно конструировала наноразмерные частицы, специально синтезируя производные хитозана заданного строения, обеспечивающего полисахариду не свойственные ему растворимость во всем диапазоне рН и способность к гидрофобным взаимодействиям. Для оптимизации гидрофильно-липофильных и кислотно-основных свойств хитозан модифицировали в 2 стадии: получение N-оксисукцинимидного эфира жирной кислоты и ацилирование в водно-органической среде. Это позволило диссертанту путем самосборки и комплексообразования полиэлектролитов сформировать наночастицы, содержащие иммобилизованные аллергены, а также разработать метод капсулирования белков в наноразмерные частицы путем электрораспыления смешанного раствора хитозана и активированного карбодиимидом рекомбинантного белка с последующим молекулярным наслаиванием альгината натрия (Глава 3.1). Методом самосборки в наночастицы лаурисукцинилхитозана-альгината включены белки из аллергенов КДП *D. farinae* и гриба *A. fumigatus*.

В главе 3.2. проведена комплексная характеристика капсулированных белков-аллергенов. Сначала были выбраны сыворотки, распознающие рекомбинантные белки, и разработана методика ИФА для оценки эффективности связывания IgE с капсулированными формами белков. В результате установлено, что двойная упаковка полностью предотвращала связывание белка с иммуноглобулином E, в то же время *in vivo* анализ индукции гуморального иммунного ответа показал, что капсулирование аллергенов не снижает иммуногенности белков, что было показано по продукции IgG антител при иммунизации мышей капсулированными и свободными белками: индукция синтеза IgG антител к аллергенам не зависит от

того, является ли аллерген капсулированным или используется в составе адъювантного протокола.

Достоверность полученных автором результатов и выводов по ним определяется большим числом экспериментов и математической обработкой полученных результатов, использованием надежных физико-химических и биологических методов исследования (протонный ^1H -ЯМР, динамическое светорассеяние, конфокальная лазерная микроскопия, электрофорез в ПААГ, модуляционно-интерференционная микроскопия, спектрофотометрия, флуоресцентная спектрофотометрия, иммуноферментный анализ, проточная цитометрия, совокупность методов работы с животными), а также согласованием результатов экспериментов *in vivo* и *in vitro*. Достоверность полученных результатов проверена при проведении АСИТ, в которая показала появление IgG антител, значительное снижение длительности терапии и повышение ее безопасности (Глава 3.3).

Научную новизну и практическую значимость имеют следующие, полученные автором результаты.

Обоснована методология конструирования наноразмерных форм капсулированных белков-аллергенов на основе производных хитозана и альгиновой кислоты, которая может быть использована для создания вакцин с любыми белками или пептидами. Разработана структура нанокапсулированных форм аллергенов, которая предотвращает контакт IgE с белком, но сохраняет его иммуногенность, и впервые получены капсулированные вакцины на основе рекомбинантных аллергенов из клещей домашней пыли *D. farinae* и грибов *Aspergillus fumigatus*. Впервые исследованы механизмы действия АСИТ и *in vivo* показано, что индукция IgG к аллергенам приводит к медленному снижению IgE, а отсутствие эффекта снижения титров IgE сопровождается клиническим улучшением, что связано с механизмами, не зависящими от IgE опосредованных реакций.

Автореферат диссертации полностью отражает содержание работы и позволяет ознакомиться с логикой исследования и выводами автора. Основные

материалы диссертации опубликованы в 7 статьях в журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, и в материалах 12 отечественных и международных конференций.

Недостатки работы во многом являются продолжением ее достоинств. Диссертант использует способ изложения материала с подробным обоснованием не только методологии и методик, но и каждого из используемых компонентов, вплоть до растворителей, буферных растворов, рН-среды и т.п. С одной стороны, это указывает на тщательность постановки эксперимента, но с другой, затрудняет восприятие материала, маскируя значимые результаты.

Из текста диссертации очевидно, что часть выполненной работы осталась за пределами диссертации, что не всегда обосновано. Например, на стр. 98 «В процессе исследований было установлено, что для получения конструкций оптимального размера ... реакцию следует проводить при следующих условиях», однако, сами исследования не приводятся. На стр. 101 «Увеличение процентного содержания этанола в растворителе способствует повышению вязкости раствора», однако не приведены соответствующие экспериментальные зависимости или ссылки на опубликованные работы, а в таблице 7 вязкость упоминается только на качественном уровне «низкая вязкость». Не ясно, был ли разработан автором или использовался известный прием формирования наночастиц лаурилсукциноилхитозана путем диализа его водно-спиртового раствора.

В диссертации и автореферате встречаются опечатки и неудачные выражения: «природа материала дисперсной фазы и дисперсионной среды», средний размер частиц в таблице 6 ЛСХ2 указан 50-1280 нм (это доверительный интервал, а не среднее значение). «Хитозан является производным хитина, природного поликатиона» (поликатионом является хитозан, а не хитин).

Следует подчеркнуть, что эти замечания не снижают общего хорошего впечатления, сложившегося после ознакомления с работой. В целом считаю, что рецензируемая диссертация представляет собой актуальное исследование, выполненное на высоком научном уровне и имеющее практическое значение.

Заключение

Диссертационная работа Е.И. Кашириной, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук является законченной квалификационной научно-исследовательской работой, в которой решена актуальная научная задача создания новых биополимерных конструкций, безопасных и эффективных для аллергенспецифической терапии, имеющая значение для биотехнологии и медицины.

Диссертационная работа Е.И. Кашириной соответствует паспорту специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в части формулы специальности и области исследований.

Диссертационная работа Кашириной Елены Игоревны **соответствует критериям**, установленным "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 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Кильдеева Наталия Рустемовна

доктор химических наук, профессор

Заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и нанокompозитов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)»

117997, г. Москва, ул. Садовническая, д.33, стр. 1.

Тел.: +7(495)955-33-05 E-mail.: kildeeva@mail.ru

19 февраля 2018 года

Подпись д.х.н. проф. Кильдеевой Н.Р. заверяю

Парахин Владимир Александрович – ученый секретарь Ученого совета РГУ им. А.Н.Косыгина

