

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Сурина Александра Михайловича на диссертационную работу 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»

Актуальность темы выполненной работы

Представленная к защите работа является примером биохимической инженерии «магической пули» - концепции, сформулированной Паулем Эрлихом почти 120 лет тому назад. Несмотря на столь солидный срок, проблема становится все более актуальной, поскольку рост количество новых мишеней для лекарственных средств опережает увеличение количества принципиально новых молекулярно-биологических, генно-инженерных и т.д. конструкций, предназначенных для борьбы с патологиями и заболеваниями организма. В этой связи, создание лекарственных средств, базирующихся на целевой доставке действующего вещества, является одной из самых актуальных задач как фундаментальной биологии и медицины, так и прикладных направлений в фармакологии и технологии разработки медицинских препаратов. Автор диссертационного исследования следовала в направлении решения этой актуальной проблемы стратегически наиболее выверенным путем. Биологически активное вещество было заключено в фосфолипидную мембрану-оболочку или само служило компонентом мембраны. Клетки-мишени активировали, имитируя воспалительный процесс в очаге поражения и, одновременно, добиваясь появления специфических рецепторов, обеспечивающих целенаправленное связывание липосом с именно этими клетками эндотелия сосудов. Одновременно липосомы метили флуоресцирующими соединения, добиваясь возможности детекции не только процессов связывания, но и перемещений и преобразования структуры липосом в цитоплазме клеток-мишеней. Учитывая это, можно утверждать, что представленная к защите работа Анны Сергеевны Алексеевой является

очень актуальной как по намеченной цели, так и по методическим новациям, разработанным в процессе ее достижения.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа А.С. Алексеевой построена в основном по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Результаты исследования и их обсуждение, Экспериментальная часть Выводы, и завершается списком использованных литературных источников. Однако имеются и отличия в оформлении от наиболее привычных схем: (1) Заключение не вынесено в отдельный раздел, а распределена по завершающим частям каждого параграфа **Результатов** и (2) Экспериментальная часть расположена после **Результатов**, (3) Изложению результатов собственных экспериментов предшествуют краткие литературные обзоры, нацеленные на более детальное обоснование экспериментов, составляющих содержание конкретного параграфа, (4) добавлено Приложение. Объем диссертации составляет 105 страниц, содержит 3 таблицы и 23 рисунка, включая 1 в Приложении. Список цитируемой литературы содержит 178 работ. Приведен достаточно обширный перечень международных и отечественных конференций, на которых докладывали результаты исследований (8 выступлений) и список грантов, поддержавших ее диссертационную работу.

Во **Введении** Анна Сергеевна прежде, чем обосновать актуальность задач, которые предстояло решить, кратко излагает основные достоинства липосомальных форм лекарственных веществ, перспективность их применения и историю развития этого направления в ИБХ РАН. Выбор биологически активных веществ противораковой направленности (мелфалана и метотрексата) обусловлен, в значительной мере, последним обстоятельством. Однако тонкие механизмы взаимодействия липосомальных форм мелфалана и метотрексата, а также предшественников этих веществ с клетками-мишенями не исследовались. В заключительной части Введения диссертант формулирует цели исследования и задачи, которые необходимо решить на пути к ней, и предельно сжато оглашает основные результаты.

Глава **Обзор литературы** дает достаточно полное представление об истории разработки и применении липосомальных форм, уделяя достойное

внимание зарождению этого направления в ИБХ РАН. Обзор не перегружен иллюстрациями – предпочтение отдано информативности текста. Отражены основные структурные особенности липосом, методы их конструирования, способы нацеливания на клетки- и органы-мишени. Достаточно детально рассмотрены достоинства и недостатки каждого из наиболее популярных методов создания и использования липосом. Возможно, Анне Сергеевне стоило уделить отдельные параграфы применению проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии при исследовании взаимодействия липосом с клетками, поскольку благодаря применению этих методов были получены основные и наиболее интересные результаты.

Считаю необходимым отметить, что доля цитируемой литературы, появившейся в печати за время выполнения А.С. Алексеевой диссертационного исследования, составляет почти четверть от всего списка. Это один из самых высоких показателей среди диссертационных работ, пришедших мне на оппонирование.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Опираясь на анализ данных литературы и применив арсенал подробно описанных в Экспериментальной части методов, А.С. Алексеевой впервые удалось показать следующее:

1. Включение липофильного SiaLe^X-конъюгата в состав липосом, сформированных на основе природных фосфолипидов и липофильного пролекарства мелфалана (Mlph-DG), позволяет липосомам специфически связываться с эндотелиальными клетками. Количество связавшихся липосом резко возрастает при активации клеток провоспалительным цитокином.
2. Активированные клетки могут в течение минут захватывать связанные SiaLe^X-липосомы. Проникшие в цитоплазму липосомы, дестабилизируются и высвобождают пролекарство Mlph-DG.
3. Диацилглицерольное производное метотрексата (пролекарство MTX-DG), включенное в липосомы на основе природных фосфолипидов, способно взаимодействовать с опухолевыми клетками более эффективно, чем с клетками не раковых линий.

4. Эндоцитоз липосом с MTX-DG осуществляется, вероятно, по клатрин-независимому пути. Не исключено участие рецепторов плазмалеммы, но, вероятно, без рецептора фолата и транспортера восстановленных фолатов.
5. Синтезирован флуоресцентный аналог MTX-DG позволивший определить в динамике ко-локализации липосом с плазматической мембраной и внутриклеточными компартментами (эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом Гольджи).

Выводы, представленные в финале диссертации, убедительно отражают основные достижения работы.

Теоретическая и практическая значимость.

Исследование взаимодействия клеток со структурами, имеющими такие размеры и сложность устройства, какие характерны для липосом, предназначенных для целевой доставки в клетки биологически активного вещества (лекарственного или его предшественника), является чрезвычайно сложной задачей. Трудность проблемы усугубляется тем, что эти процессы значительно различаются для разных типов клеток и даже для клеток одного типа зависят от фазы развития и условий приготовления и поддержания культуры. Поэтому исследования, подобные тем, которые выполнила А.С. Алексеева, являются неоспоримо ценным теоретическим вкладом в познание закономерностей жизненного цикла клеток и методов управления ими. Созданный при диссертационном исследовании инструментарий - синтез флуоресцентных аналогов, анализ клеточных структур с применением нескольких флуорофоров, сочетание нескольких оптических методов анализа является, служит базисом исследования и придает ему неоспоримую практическую значимость. Например, в перспективе исследования распределения липосом, включающих флуоресцентные производные противораковых препаратов, в организме лабораторных животных *in vivo*.

Экспериментальная часть содержит описание основных методов исследования, перечень которых весьма солидный и почти каждый метод изложен настолько подробно, что напоминает протокол исследования. Анна Сергеевна продемонстрировала высокую квалификацию синтетика в области

химии липидов и сопряженное с этим умение разностороннего анализа структуры и чистоты полученных продуктов. Базис химика-органика и навыки аккуратной работы позволили успешно провести такую далекую от синтеза работу, как культивирование разнообразных клеточных линий и проведение исследований с ними. Необходимо отметить, что эти исследования были чисто биофизическими и требовали знаний фундаментальных основ флуоресцентной микроскопии и цитофлуориметрии, умении оптимально спланировать эксперимент и достаточно уверенной подготовки в технике проведения измерений. Судя по качеству изображений, А.С.Алексеева прекрасно справилась с методом иммуноцитофлуоресцентного окрашивания. Некоторое упущение в этом направлении – не приведен количественный анализ колоколизации флуоресцентно-меченых липосом с внутриклеточными структурами. Работа была бы еще более интересной и информативной, если бы рассмотрели локализацию липосом и митохондрий. Кинетические измерения выполнены на высоком уровне особенно с учетом того, насколько непросто бывает получать клеточные культуры с воспроизводимыми свойствами на протяжении длительного периода выполнения работы.

Замечания к диссертации:

- 1) В оформлении имеются небольшие поправки:
При описании объекта исследования сказано (стр. 39) «...дополнительно включали ... Rhod-меченый фосфатидилхолин...», хотя имеется ввиду Rhod-меченый фосфатидилэтаноламин.
- 2) Не указано насколько достоверны отличия относительных изменений параметров, представленных на рисунках 7А, 8А, 9А, 10А, 11, 16 Б, 17Б и в таблицах.
- 3) Рис. 16. На графиках панели А показаны (4-8)-кратные различия между накоплением клетками липосом, содержащих МТХ-DG, и «пустых» липосом, тогда как те же характеристики на панели Б имеют гораздо меньшие отличия (не более 1,5-кратных). Необходимо было разъяснить причину таких различий.
- 4) При анализе причин эффективного ингибирования хлорпромазином накопления клетками липосом с МТХ-DG рассматривается влияние этого ингибитора только на клатрин-опосредованный эндоцитоз, но не

учитывается его ингибирующее действие на целый ряд метаболитных рецепторов, представленных на плазматической мембране (допаминовых, серотониновых, альфа-адренорецепторов, ацетилхолиновых). Следовало рассмотреть возможность того, что с какими-то из этих рецепторов связан «...дополнительный путь проникновения липосом в клетку...», обнаруженный диссертантом при использовании хлорпромазина.

Изложенные выше замечания имеют рекомендательный характер, не являются указанием на принципиальные ошибки, а скорее относятся к не всегда удачному изложению и не подвергают сомнению адекватность использованных методов и надежность полученных результатов. Работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком теоретическом и методическом уровне, опирающейся на очень солидную методическую базу.

Общее впечатление о диссертационной работе

Примененные А.С. Алексеевой методы органического синтеза, приготовления клеточных культур, молекулярно-биологические и биофизические методы адекватно подходят для решения поставленных задач. Работа выполнена с использованием большого объема экспериментальных материалов и привлечением современных методов ведения разных типов культур клеток, анализа рецепторного репертуара клеток. Представленные результаты выглядят убедительно, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Полученные А.С. Алексеевой результаты важны как для понимания фундаментальных принципов связывания липосом с поверхностными рецепторами клетки, в частности, с селектинами, так и для расшифровки внутриклеточных процессов, приводящих к высвобождению лекарственного вещества или его предшествующей форме в цитозоле клеток-мишеней.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, результаты которой достаточно полно отражены в 3 статьях, в научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертации, а также в тезисах докладов и материалах 8 конференций.

Заключение

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует критериям для кандидатских диссертаций, установленным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 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 ее автор, Алексеева Анна Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Главный научный сотрудник лаборатории
фундаментальных и прикладных проблем боли
ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»
доктор биологических наук
Адрес: 125315 Россия, Москва, Балтийская ул., 8
Тел: +7(916)498-9413; e-mail: surin_am@mail.ru

Сурин А.М.

Подпись д.б.н. Сурина А.М.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИОПН»

Кандидат медицинских наук

Скураговская Л.Н.

«27» апреля 2018 года

МП

