

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Алексеевой Анны Сергеевны «Механизмы взаимодействия с клетками противоопухолевых липосом с липофильными пролекарствами», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия»

Работа А.С. Алексеевой посвящена исследованию механизмов взаимодействия липосом, содержащих липофильные пролекарственные формы противоопухолевых агентов мелфалана и метотрексата, с клетками *in vitro*, а также процессов интернализации и внутриклеточного транспорта липосом с использованием набора флуоресцентных методов анализа (флуоресцентная спектроскопия, конфокальная микроскопия и проточная цитометрия).

Одним из наиболее важных критериев оценки любого противоопухолевого агента является избирательность его цитотоксического воздействия на опухолевые клетки. Результаты, полученные ранее в Лаборатории химии липидов ИБХ РАН, свидетельствуют об усилении противоопухолевого эффекта липосом, содержащих мелфалан в сочетании с углеводным лигандом селектинов (SiaLe^X). Используя в качестве модели эндотелия сосудов в очаге хронического воспалительного процесса, обусловленного опухолью, эндотелиальные клетки, активированные провоспалительным цитокином ФНО- α , А.С. Алексеева показала, что липосомы, включающие в свой состав липофильные формы пролекарства мелфалана и конъюгата SiaLe^X, характеризуются преимущественным (в 5-6 раз большим) накоплением в активированных клетках по сравнению с нормальными клетками эндотелия. Обнаружение этого эффекта представляется одним из двух наиболее важных результатов первой части работы. Вторым является детальная визуализация процессов связывания, интернализации, транспорта и «разгрузки» SiaLe^X-липосом, выполненная методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Кинетика указанных процессов, обнаруженная лишь для активированных ФНО- α (но не для интактных) клеток эндотелия, характеризовалась быстрым (в течение минут) связыванием и интернализацией липосом с последующей более замедленной «разгрузкой».

Во второй части работы, А.С. Алексеевой изучались механизмы взаимодействия опухолевых клеток с липосомами, содержащими липофильное пролекарство метотрексата (MTX-липосомы). Было обнаружено, что опухолевые клетки и нормальные клетки значительно лучше (в 3-4 раза) накапливают MTX-липосомы, чем пустые липосомы, причем опухолевые клетки накапливают MTX-липосомы приблизительно в 2 раза лучше, чем нормальные клетки. Исследование механизма связывания MTX-липосом с клетками позволило исключить участие фолатного рецептора и транспортера восстановленных фолатов, а применение ряда ингибиторов эндоцитоза обнаружило наличие нескольких возможных механизмов проникновения липосом внутрь клетки, из которых клатрин-опосредованный механизм был наиболее заметен. Самой яркой частью второй части работы А.С. Алексеевой явилось изучение кинетики связывания, накопления и «разгрузки» MTX-липосом в опухолевых клетках, для чего был синтезирован новый флуоресцентный BODIPY-меченый аналог липофильного пролекарства метотрексата. Оказалось, что процессы взаимодействия опухолевых клеток с липосомами и последующие внутриклеточные события были значительно более медленными, чем в случае взаимодействия активированных клеток эндотелия с SiaLe^X-липосомами, и требовали многочасовых исследований. Однако это лишь поспособствовало более детальной и наглядной визуализации указанных процессов методом конфокальной микроскопии (см. Рис. 11 и 12 автореферата).

Полученные новые данные нашли свое отражение в трех опубликованных статьях в рецензируемых журналах и были представлены на нескольких научных конференциях и симпозиумах.

В части замечаний к работе позволю отметить следующее:

1) При оценке количества связанных с мембраной и интернализированных SiaLe^X-липосом (см. стр. 11 автореферата) делается вывод, что «... при избытке липосом в среде активированные клетки HUVEC накапливают около 15000 SiaLe^X-липосом на одну клетку за 1 час инкубации». Несложный расчет покажет, что объем 15000 SiaLe^X-липосом составит лишь около 1% от объема клетки. Возникает вопрос: не является ли это расчетное количество заниженным, исходя из заметно высокой интенсивности сигнала внутриклеточной флуоресценции по данным конфокальной микроскопии?

2) Считаю, что было бы очень выигрышно представить результаты конфокальной микроскопии (см. Рис. 6B), соответствующие точке «20 минут». В этом случае, заметный (более чем на треть от максимального) сигнал от связавшихся липосом сопровождался бы низким сигналом от «разгрузившихся» липосом. Представленные на рисунке данные в точке «40 минут» описывают одновременно оба события (связывание и «разгрузку»).

Представленные замечания никоим образом не снижают ценности диссертационной работы. Ясность и актуальность поставленных А.С. Алексеевой задач и их последующее успешное решение на высоком профессиональном уровне позволило получить результаты, отличающиеся научной новизной и практической значимостью.

Таким образом, содержание автореферата позволяет сделать вывод, что диссертационная работа Алексеевой Анны Сергеевны 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 ее автор достойна присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия.

Кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник Отдела медицинской химии и токсикологии
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России
Телефон: +7-916-815-5258
e-mail: mvmalakhov@yandex.ru

Малахов Михаил
Валентинович

Подпись М.В. Малахова удостоверяю.
Ученый секретарь ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России, доктор медицинских наук, доцент



Милушкина Ольга
Юрьевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1

Телефон: +7 (495) 434-14-22

Адрес электронной почты: rsmu@rsmu.ru