

«Утверждаю»

Проректор Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»



А.А. Федянин

А.А.Федянин

«03» июня 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» на диссертационную работу Третьяковой Дарьи Сергеевны на тему «Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови», предоставленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности: -02.00.10 - «биоорганическая химия»

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертационной работы **Третьяковой Дарьи Сергеевны** на тему «Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с компонентами плазмы крови», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - «биоорганическая химия».

Диссертационная работа Д.С. Третьяковой связана с решением важной научно-практической задачи – разработкой систем доставки противоопухолевых лекарств с целью снижения их общей токсичности для организма человека. Высокая системная токсичность химиотерапевтических средств продолжает оставаться одной из главных проблем клинической онкологии. Включение лекарств в наноразмерный носитель позволяет понизить системную токсичность за счет уменьшения концентрации свободного препарата в кровотоке и, в то же время, усиления поглощения опухолевой тканью. Липосомы – фосфолипидные нано- и микровезикулы – отличаются наибольшей био- и гемосовместимостью среди всех систем доставки лекарств. Липосомальные препараты занимают лидирующую позицию на мировом рынке наномедицинских средств. Однако спектр представленных в этих препаратах противоопухолевых молекул невелик, поскольку для веществ различной природы требуется разработка конкретной формуляции, оптимизированной с точки зрения преодоления физиологических барьеров на пути к

целевым клеткам и тканям. Первый такой барьер при системном введении — взаимодействие с компонентами плазмы крови. Работа Д.С. Третьяковой посвящена изучению состояния в плазме крови наноразмерных липосом на основе природных фосфолипидов, несущих в бислое липофильные пролекарства важнейших в онкологической клинике химиотерапевтических средств различного типа действия: алкилирующего агента мелфалана и метотрексата, антиметаболита фолиевой кислоты.

Целью настоящей диссертационной работы явилось изучение влияния стабилизирующих молекул в бислое на взаимодействия наноразмерных липосом, нагруженных диолеилглицеридными сложноэфирными конъюгатами мелфалана и метотрексата, с компонентами плазмы и крови. Обе системы доставки, разработанные в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, уже зарекомендовали себя как перспективные препараты для терапии ряда опухолей на мышинных моделях. Однако сведений о состоянии этих препаратов при введении в системный кровоток было получено немного. В тестах *in vitro* была показана гемосовместимость препаратов — они не вызывали разрушения эритроцитов и агрегации тромбоцитов крови человека. Но, в отличие от инертных липосом с пролекарством мелфалана (Mph-липосомы), липосомы с пролекарством метотрексата (MTX-липосомы) вызывали активацию системы комплемента (СК). Позже было обнаружено дифференциальное связывание некоторых белков СК при инкубации липосом с разными пролекарствами в плазме. Однако путь активации СК под действием MTX-липосом оставался невыясненным. Также ничего не было известно о состоянии в плазме липосомального бислоя, несущего пролекарства, и неясно было, оптимален ли базовый состав липидной матрицы препаратов, которые уже применялись для лечения животных с опухолями. Введение в мембрану липосом компонентов, экранирующих от взаимодействий с белками, способно повысить стабильность бислоя и уменьшить вероятность дестабилизации, опсонизации и преждевременного выведения из кровотока за счет поглощения лейкоцитами.

В связи со всем сказанным, для достижения поставленной цели были намечены следующие **задачи**: проверить участие классического и альтернативного путей в активации системы комплемента MTX-липосомами; исследовать взаимодействия MTX-липосом с субпопуляциями лейкоцитов крови человека, как последствия опсонизации липосом белками СК, при этом определить влияние на этот процесс защитных амфифильных молекул, отличных от конъюгатов полиэтиленгликоля, в том числе фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ и липидного конъюгата N-карбоксиметилированного олигоглицина (пептидолипида SMG-PE); исследовать стабильность липосом с пролекарством мелфалана (не активирующих СК) в сыворотке крови человека и влияние

Во **Введении** диссертант дает общее обоснование актуальности исследования, формулирует цель и задачи предстоящей работы, характеризует научную новизну и практическую значимость полученных результатов, приводит справку о методологии и методах исследования, формулирует основные положения, выносимые на защиту, и приводит сведения об апробации и публикациях по теме диссертации.

Обзор литературы посвящен всестороннему рассмотрению имеющихся на сегодня сведений о взаимодействиях наночастиц, в том числе липосом, с компонентами плазмы и крови в свете влияния этих взаимодействий на биораспределение и иммуногенность наночастиц. В первой части достаточно подробно проанализировано влияние физико-химических свойств наночастиц разнообразной природы на их взаимодействия с белками плазмы. Далее рассмотрены данные о взаимодействии липосом с белками плазмы. Отмечается, что детали процессов сорбции белков плазмы крови на развитой поверхности наноразмерных липосом того или иного вида исследованы недостаточно. Особое внимание уделено компонентам СК, поскольку взаимодействия с ними часто приводят к развитию острых инфузионных реакций при введении наномедицинских препаратов, в том числе, на основе полиэтиленгликоль-содержащих липосом. В третьей части Обзора приведены сведения о взаимодействиях липосом с форменными элементами крови. Затем описаны методы изучения белковой короны. В конце Обзора имеется заключение – полезный раздел, который не всегда встречается в обзорах литературы кандидатских диссертаций. В целом, проведенный автором анализ публикаций дает достаточно полное представление по исследуемому вопросу.

В разделе **Материалы и методы** описаны использованные в работе инструментальные методы (УФ и флуоресцентная спектроскопия, ИК-спектроскопия, динамическое рассеяние света, проточная цитометрия), воспроизведена методика трехстадийного синтеза липофильного пролекарства метотрексата, приведены методики получения липосом, описаны биохимические методы анализа (электрофорез и иммуноблоттинг). Эта часть работы изложена четко и понятно и дает представление о высоком методическом уровне поставленных экспериментов.

В главе **Результаты и их обсуждение** представлены оригинальные экспериментальные данные и их интерпретация. Изложенный материал позволяет сделать вывод, что поставленные в диссертационной работе цели и задачи были выполнены. В работе исследовано образование комплексов липосом с рядом функционально важных белков плазмы крови человека, определяющих судьбу липосомальных препаратов в кровотоке. Изучено влияние композиции липосом, в том числе наличия экранирующих компонентов в мембране, на их стабильность в сыворотке крови, а также на

иммуноблоттинг), Эта часть работы изложена четко и понятно и дает представление о высоком методическом уровне поставленных экспериментов.

В главе **Результаты и их обсуждение** представлены оригинальные экспериментальные данные и их интерпретация. Изложенный материал позволяет сделать вывод, что поставленные в диссертационной работе цели и задачи были выполнены. В работе исследовано образование комплексов липосом с рядом функционально важных белков плазмы крови человека, определяющих судьбу липосомальных препаратов в кровотоке. Изучено влияние композиции липосом, в том числе наличия экранирующих компонентов в мембране, на их стабильность в сыворотке крови, а также на взаимодействия с лейкоцитами как следствие опсонизации. Исследовано влияние сывороточного альбумина на структуру липидного бислоя липосом в зависимости от присутствия экранирующих молекул.

Основные результаты работы состоят в следующем.

1. Автором получены новые данные о связывании белков системы комплемента липосомами с пролекарством метотрексата, которые позволили сделать вывод о том, что активация СК МТХ-липосомами осуществляется по механизмам как классического, так и альтернативного путей.

2. Обнаружено, что пролекарство метотрексата в мембране липосом стимулирует их фагоцитоз моноцитами в крови человека независимо от наличия экранирующих молекул, в том числе фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ и пептидолипида SMG-PE. Механизм этого явления вероятнее всего заключается в том, что все изученные МТХ-липосомы вызывают фрагментацию центрального компонента СК белка С3 и образуют комплексы с продуктами расщепления его фрагмента С3b, рецепторы к которому экспрессированы на моноцитах. В связи с этим МТХ-липосомы могут представлять интерес как для лечения опухолевых, так и воспалительных заболеваний, в патобиологии которых моноциты играют важную роль. С другой стороны, необходимо учитывать возможность возникновения инфузионных реакций.

3. Установлено, что фосфатидилинозит стабилизируют базовые жидкофазные липосомы на основе яичного фосфатидилхолина, нагруженные пролекарством мелфалана, в сыворотке крови человека не менее 4 ч, что имеет терапевтическое значение. Но особенно хорошими стабилизаторами оказались ганглиозид GM₁ и пептидолипид SMG-PE: липосомы сохраняли целостность не менее 24 ч.

4. Показано, что связывание сывороточного альбумина на поверхности Мрh-липосом, содержащих фосфатидилинозит или ганглиозид GM₁, не влияет на структуру

липидного бислоя. В отсутствие экранирующих молекул альбумин внедряется в гидрофобную часть липидного бислоя, конформация белка меняется и он агрегирует.

5. Обнаружено на примере липосом с пролекарством мелфалана, что пегилирование жидкофазной или гелевой мембраны способствует быстрому разрушению липосом в сыворотке. Показано, что включение конъюгата полиэтиленгликоля с липидом (10 мол %) обеспечивает стабилизацию липидного бислоя, содержащего достаточное количество холестерина (30 мол %), то есть находящегося в так называемой жидкокристаллической упорядоченной фазе (liquid ordered). разрушению в сыворотке. Эффект дестабилизации пегилированных жидкофазных и гелевых мембран важно учитывать при конструировании супрамолекулярных систем доставки лекарств, таких как липосомы, липидные наносферы, мицеллы.

Резюмируя, можно сказать, что диссертационная работа Д.С. Третьяковой выполнена на очень высоком методическом уровне. **Выводы** соответствуют изложенным результатам.

По материалам диссертации есть ряд **вопросов и замечаний**.

1) В разделах изучения целостности липосом с помощью метода вытекания кальцеина разброс данных на графиках указан только на рисунках 28А и 30, причем не указан тип ошибки (SD/SE) и число измерений. На рисунках 13,14 и 31 разброс данных на кривых отсутствует.

2) В разделе исследований взаимодействия сывороточного альбумина с липосомами с помощью ИК-спектроскопии приведен только один пример спектра, полученного в ходе инкубации (рис. 20). Не представлены экспериментальные спектры для различных липосом и их комплексов с белком.

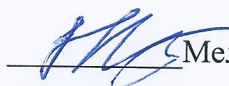
3) В ИК-спектрах не проанализированы изменения пиков PO_2 и Амид II и нет информации по сигналам от характеристических фрагментов полярных головных групп фосфолипидов и пролекарства (холиновая группа, фенильное кольцо мелфалана).

Приведенные замечания не снижают общего высокого уровня исследования, не влияют на научную и практическую значимость результатов диссертации и не изменяют положительного впечатления от работы. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Автореферат дает полное представление о структуре работы и результатах.

Таким образом, диссертация Третьяковой Дарьи Сергеевны является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития биоорганической химии, а именно: показано, что

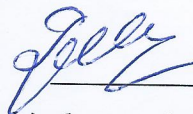
введение липофильного пролекарства метотрексата в мембрану липосом стимулирует их захват моноцитами крови человека. В связи с этим МТХ-липосомы представляют интерес не только для терапии злокачественных заболеваний крови, но и для лечения ряда воспалительных заболеваний, в патобиологии которых участвуют моноциты, например, таких как артрит, воспалительные заболевания кишечника, хроническая обструктивная болезнь легких и различные формы гломерулонефрита. Диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу и соответствует всем требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. N 842 "О порядке присуждения ученых степеней" (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ от: 21 апреля.2016 г. № 335; 02 августа 2016 г. № 748; от 29 мая 2017 г. № 650), а сам автор Третьякова Дарья Сергеевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - «биоорганическая химия»

Отзыв подготовил

 Мелик-Нубаров Николай Сергеевич

Отзыв заслушан и утвержден на заседании кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, протокол заседания № 05/20 от «21» мая 2020 г.

Заведующий кафедрой высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, , член-корр. РАН, д.х.н

 А.А. Ярославов

Почтовый адрес: Москва 119991, улица Ленинские горы д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, кафедра высокомолекулярных соединений

Телефон: 8(495)939-31-27

Электронная почта: melik.nubarov@genebee.msu.ru

Секретарь заседания, ученый секретарь кафедры высокомолекулярных соединений, доцент, к.х.н.

 Л.Д. Ужинова

Декан Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, член-корр. РАН, д.х.н

 С.Н.Калмыков