

ОТЗЫВ

*официального оппонента на диссертацию Анны Сергеевны Алексеевой
“Механизмы взаимодействия с клетками противоопухолевых липосом
с липофильными пролекарствами”,
представленную на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия*

Диссертационная работа А.С. Алексеевой связана с решением важной научно-практической задачи – разработкой способов направленной доставки биологически активных (лекарственных) веществ. В качестве доставляемых лекарств автор использовал два противоопухолевых препарата – мелфалан и метотрексат. Эти препараты хорошо зарекомендовали себя в противоопухолевой терапии, но требуют высоких доз, что часто сопровождается развитием системной токсичности и лекарственной устойчивости. Для устранения этих недостатков автором были синтезированы лекарства с гидрофобными (липидными) заместителями – «липофильные пролекарства», которые в дальнейшем были встроены в мембраны бислойных липидных везикул (липосом). Этот прием позволил получить конструкции с достаточно высокой концентрацией лекарственных веществ, которые в дополнение к этому были способны специфически взаимодействовать с клетками-мишенями: для липосом с метотрексатом это были клетки с повышенным уровнем экспрессии фолатных рецепторов, для липосом с мелфаланом и углеводным лигандом селектинов мишенями выступали клетки, содержащие рецептор E-селектин на своей поверхности. Эти возможности были использованы для исследования ключевых стадий взаимодействия липосомального лекарства с клетками: связывания липосом с поверхностью клеток-мишеней, проникновения их в клетки и внутриклеточной разгрузки липосом (высвобождения лекарства). Сказанное выше свидетельствует об актуальности и практической значимости работы А.С. Алексеевой.

Рецензируемая диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, литературного обзора, результатов и их обсуждения, раздела с описанием

материалов и методов, выводов, благодарностей, списка цитируемой литературы и приложения со спектральными характеристиками синтезированного автором флуоресцентного производного метотрексата. Работа изложена на 105 страницах, включая рисунки, таблицы и химические формулы.

В *Литературном обзоре* излагаются принципы, лежащие в основе создания наноразмерных систем доставки лекарств, и описывается эволюция таких систем – от пассивного к активному транспорту лекарств и затем к их внутриклеточному нацеливанию. Основное внимание уделено липосомальным формам лекарств, получившим широкое распространение в экспериментальной и клинической практике. Специальный раздел посвящен рассмотрению процесса эндоцитоза (захвата внешнего материала клеткой) и параметров, которые влияют на внутриклеточный транспорт лекарств.

В *Экспериментальной части* описаны использованные в работе инструментальные методы (УФ и флуоресцентная спектроскопия, проточная цитометрия и конфокальная микроскопия), методики получения липосом, культивирования клеток, контроля внутриклеточного распределения липосом и их внутриклеточной разгрузки и прочее. Эта часть работы изложена четко и понятно и дает представление о высоком методическом уровне поставленных экспериментов.

В главе *Результаты и Обсуждение* представлены оригинальные экспериментальные данные и их интерпретация.

Основные результаты работы состоят в следующем.

1. Главное достижение автора заключается в попытке дать количественное описание отдельных стадий процесса взаимодействия липосомальных лекарств с клетками. Перед проведением клеточных экспериментов автор убедился в том, что встраивание липидных производных лекарств в липосомальную мембрану не отражается на размере липосом и их целостности. Полученные липосомы сохраняются в физиологическом растворе в интервале температур от 4 до 37 °С.

2. В экспериментах с липосомами, содержащими мелфалан и углеводный лиганд селектинов (SiaLe^X-конъюгат), было показано их специфическое связывание с активированными эндотелиальными клетками и незначительное связывание с

неактивированными клетками. Суммарное количество связанных активированными клетками SiaLe^X-липосом, содержащих 2 мол. % вектора, на 40-50% превышает этот показатель для липосом без вектора, а при включении в липосомы 10 мол. % SiaLe^X в отдельных экспериментах показано увеличение их накопления до 14 раз. На следующей стадии SiaLe^X-липосомы проникают внутрь клеток и высвобождают лекарство, этот процесс развивается в течение нескольких минут.

3. Липосомы со встроенным в мембраны производным метотрексата (МТХ-липосомы) связываются опухолевыми и нормальными клетками в соотношении 4/1. МТХ-липосомы остаются на цитоплазматической мембране в течение 1,5-2 ч, после чего пролекарство и липиды медленно поступают в цитоплазму, уже разделившись на отдельные везикулярные структуры.

4. В ходе восьмистадийного синтеза с выходом 26% получен новый зонд для изучения внутриклеточного распределения липосом – флуоресцентный аналог метотрексата с BODIPY-меткой при концевом метиле алифатической цепи. Квантовый выход для зонда (λвзб/λэм 498 нм/506 нм) составил 0.636.

В заключение несколько критических замечаний, которые возникают при знакомстве с работой А.С. Алексеевой.

1. В работе встречаются повторы. Например, в главе *Результаты и Обсуждение* снова описываются структура и функции селектинов, механизм действия метотрексата, перечисляются задачи исследования. Эту информацию следовало поместить в *Литературном обзоре*.

2. Производные мелфалана и метотрексата должны располагаться на внешней и внутренней стороне липосомальной мембраны. Есть ли какие-то соображения относительно распределения лекарства между липидными монослоями?

3. Было бы полезно обсудить стабильность производных мелфалана и метотрексата, встроенных в липосомальную мембрану, в биологическом окружении (в присутствии ферментов).

Высказанные замечания не снижают общего приятного впечатления от работы А.С. Алексеевой. 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. Содержание публикаций достаточно полно отражает результаты исследования, изложенные в диссертационной работе.

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.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент Российской академии наук,
заведующий кафедрой высокомолекулярных соединений Химического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Ярославов Александр Анатольевич

119991, Москва, ГСП-1,
Ленинские горы, д. 1, стр. 3,
тел. (495)939-55-83,
e-mail: yaroslav@genebee.msu.ru

И.о. декана
Химического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова
член-корреспондент Российской академии наук
профессор



Калмыков Степан Николаевич