

О Т З Ы В

официального оппонента

на диссертацию Антона Дмитриевича Алексашкина

«Наночастицы супероксиддисмутазы 1: получение, свойства, верификация терапевтической эффективности на модели контузионной травмы спинного мозга», представленной на соискание ученой степени

кандидата химических наук

по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Современное развитие науки о живом подразумевает активное и заметное формирование изучений и разработок новых медицинских препаратов. Указанное направление отличает не только множественность форм объектов исследований, но и вовлечение в их круг высокомолекулярных соединений, как и появление новых методов конструирования таких средств. В настоящее время интенсивно исследуются в качестве лечебных производных нового поколения разнообразные ферменты с использованием бионанотехнологических подходов и приемов. Возникающая ситуация ставит и заостряет вопрос – каков продуктивный путь биомедицинских разработок – в сторону уменьшения или увеличения молекулярных размеров? Основанием этого выступили исследования активаторов плазминогена, вошедших в клиническую практику как тромболитические препараты. Следует отметить, что в большинстве исследовательских работ доминирующее место занимают производные активаторов плазминогена, превосходящие по молекулярным размерам родительские формы. Используемые же в клинической практике тромболитические препараты (метализе, ретаваза) имеют меньшие или сходные молекулярные размеры с родительскими молекулами. Такая разнонаправленность данных клинической практики и обширных исследований активаторов плазминогена обоснованно поднимает упомянутый выше вопрос.

Сегодняшняя ориентация биофармакологических исследований на разработку прорывных способов терапии, конкуренцию в наиболее обещающих открытиях областях весомерно способствует достижению эффективного клинического использования результатов трансляционной медицины. Одним из её заметных подходов стали нанотехнологические методы получения новых производных, в том числе и с использованием фармакологических биокатализаторов – ферментов.

Широкая распространенность окислительного стресса при развитии многих патологий обосновывает актуальность исследования и разработки эффективных медицинских средств его снижения и блокирования. Действенным ресурсом этого оказались наноразмерные супрамолекулярные антиоксидантные производные (Weissig V., Guzman-Villanueva D. Nanocarrier-based antioxidant therapy: promise or delusion? Expert Opin. Drug Deliv., 2015, 12 (11): 1783-1790; Richard P.U., Duskey J.T., Stolarov S. et al. New concepts to fight oxidative stress: nanosized three-dimensional supramolecular antioxidant assemblies. Expert Opin. Drug Deliv., 2015, 12 (9): 1527-1545; Lewis D.R., Petersen L.K., York A.W. et al. Nanotherapeutics for inhibition of atherogenesis and modulator of inflammation in atherosclerotic plaques. Cardiovasc. Res., 2016, 109: 283-293). Изучению наночастиц антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД) на основе блок-иономерных комплексов посвящена диссертационная работа А.Д. Алексахина. Её целью была разработка методов получения наночастиц с СОД, оценка их свойств, проведение экспериментальной терапии с нанопроизводными СОД на модели контузионной травмы спинного мозга крыс. Диссертация имеет традиционное построение (Введение, Обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, Выводов и Списка литературы [152 наименования]) и изложена на 98 страницах машинописного текста, включая 19 рисунков и 10 таблиц. Важность представленной работы подчеркивается сопровождением течения нейродегенеративных заболеваний и таких острых поражений как инсульт,

ожог, травма развитием окислительного стресса, отягощающим прогрессирование патологии.

В Обзоре литературы диссертант последовательно рассматривает вопросы повреждения митохондрий при болезни Паркинсона; дегенерацию и гибель нейронов с формированием внеклеточных агрегатов β -амилоида, гиперфосфорилирование тау-белка при болезни Альцгеймера; накопление поврежденных радикалами белков, липидов, ДНК, появление мутации в гене СОД-1, ведущей к поражению белков и липидов митохондрий и способствующих появлению амилоидозов при боковом амиотрофическом склерозе. Отмечается, что мутация в гене Гентингтона вызывает повышение тринуклеотидных повторов цитозин-аденин-гуанин (с расширением полиглутаминовых сегментов белка) и сопровождается запуском нейродегенеративного каскада при болезни Гентингтона. Материал предлагаемого изложения подчеркивает поражающее действие избыточных концентраций активных форм кислорода (АФК). Их нейтрализация антиоксидантами, в том числе антиоксидантными ферментами (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза), составляет резерв развития антиоксидантной терапии. Ему препятствует невысокая стабильность нативных антиоксидантных ферментов в организме. Преодолению отмеченных затруднений способствует развитие систем доставки лекарств, стабилизирующих ферменты от деструктирующего действия агрессивных условий среды организма и увеличивающих биодоступность лечебных энзимов. Включение биокатализаторов в наноразмерные полиионные комплексы на основе блок-сополимеров повышает стабильность ферментов. Этот факт ясно указывает на актуальность создания метода технологически достаточно простого получения стабильных наночастиц СОД. Перспективно использование послойного составления/собирания на подложке полиэлектролитов с противоположными зарядами для получения однослойных и многослойных систем с СОД. Отмеченное направление

изучения было обоснованно выбрано для выполнения настоящего диссертационного исследования.

В разделе Материалы и методы аккуратно и подробно описаны используемые в работе соединения и применяемые методы с достаточностью, способствующей их воспроизведению независимыми исследователями. Особо следует отметить информационную ценность и весьма заметную точность методов динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии для установления свойств наночастиц, продуктивные приемы очистки высокомолекулярных веществ с помощью ультрацентрифугирования и гель-фильтрации, яркую демонстрацию различия фармакокинетических профилей (кривых Каплана-Мейера) производных СОД разного вида, данные нейровизуализации, собранные благодаря выполнению магнитно-резонансной томографии.

Полученные в изучении данные показывают, что однослойные наночастицы имеют структуру ядро-оболочка, где ядром выступает молекула фермента, электростатически связанная с поликатионной цепью блок-сополимера, формирующим окружение/оболочку биокатализатора. Для таких производных СОД характерна низкая устойчивость наночастиц с возможным вытеснением начально позиционируемого исходного фермента из ядра системы другим более заряженным белком. По данным денатурирующего фореза сшивка наносистем глутаровым альдегидом (ГА) вызывает 87 % степень удержания биокатализатора, а с обработкой 3,3'-дителиобис(сульфосукцинимидила пропионатом) (ДТССП) – 69 % (стр. 60), причем отмечалась практически полная инактивация СОД сшивкой ГА (Табл. 5). Низкий уровень остаточной активности СОД после сшивки однослойных наночастиц (Таблицы 1, 3 и 5) доказательно демонстрировал необходимость применения других методов получения наночастиц СОД с достижением более высокого уровня остаточной ферментативной активности.

Исследовательский поиск, проведенный диссертантом, обнаружил, что двухслойные частицы СОД с протамином заметно более крепко удерживают цепи метокси-поли (этиленгликоль) - блок-поли (глутамата натрия) (ПГ-ПЭГ) (Рис. 12) и имеют более узкое распределение по размерам (Табл.6, стр. 69). В ряду полученных двухслойных наночастиц СОД с разным соотношением компонентов высокоактивными оказались производные СОД:протамин:ПГ-ПЭГ:этил-3-(3-диметиламинопропиламин) карбодиимид (ЭДК) состава 1:2:2:10 с остаточной активностью 28 % (табл.7, стр. 70), что в четыре раза превышало остаточную активность СОД в однослойных наночастицах, и СОД:протамин:ПГ-ПЭГ:ГА состава 1:2:2:2 с индексом полидисперсности 0,2, остаточной активностью фермента 37 % (Табл. 8, стр. 70), т.е. в пять раз выше этого параметра в однослойных наночастицах. Указанные двухслойные системы были отобраны для использования в биомедицинском изучении (стр. 72).

Его данные свидетельствовали о 30 кратном увеличении площади под фармакокинетической кривой (стр. 79-80) в сравнении с эффектом однослойных наночастиц СОД (ДТССП). Наряду с определением оптимальной дозы наночастиц СОД в сравнительных экспериментах по цитотоксичности ферментных производных с культурой клеток НЕК293 (с её большой чувствительностью к добавляемым при инкубации соединениям) достигнутое преимущество позволило диссертанту грамотно установить начальные условия для выполнения экспериментальной терапии с полученными и выбранными для изучения *in vivo* наночастицами СОД (5000 Ед. акт. / кг веса животного, стр. 81). Это значимое достижение исследовательских усилий соискателя, обоснованно способствующее выполнению конкретных экспериментов *in vivo*. Слежение за динамикой восстановления двигательной активности крыс с контузионной травмой спинного мозга (Рис. 18, стр.82) и за данными магнитно-резонансной томографии области поражения животных (Рис. 19, стр. 83) убедительно продемонстрировали значительное улучшение их состояния с практически

полным восстановлением двигательной функции в течение шести недель (стр. 82) и уменьшением объема отека и объема кист для случая двухслойных наночастиц СОД (стр. 83). Продемонстрированное практически полное восстановление животных после средней тяжести контузионной травмы спинного мозга ясно демонстрирует успешность выполненного исследовательского подхода и обоснованную перспективность его дальнейшего развития в сотрудничестве научных и клинических специалистов.

Вместе с тем, в представленном к защите диссертационном изучении имеются дискуссионные моменты. Отмечалось (стр. 53), что сшивающие агенты (ДТССП, ГА. ЭДК) могут соединять не только функциональные группы фермента и полиионов, но и связывать друг с другом функциональные группы самого биокатализатора (стр. 53). Предположительно указывается также потенциальное взаимодействие ДТССП с аминоклуппами внутри активного центра СОД, вызывающее инактивацию фермента (стр. 55). Для перехода от умозрительных заключений к обоснованной результатами экспериментов аргументации вполне целесообразно выполнение изучения влияния обработки нативной СОД сшивающими агентами на остаточную активность биокатализатора или привести доказательные данные такого вида из литературных источников, что выполнено в работе не было.

В экспериментах *in vivo* желательно наличие контрольной группы животных, получавших наночастицы без СОД. Такое примечание связано с тем, что физические, химические, биологические свойства объектов, имеющих наноразмеры, могут приобретать уникальный, а иногда и неожиданный характер (в сравнении со свойствами их компонентов), в частности из-за квантовомеханических эффектов, привносимых образованными структурами. Так, возникающая надмолекулярная структура биферментного наноконъюгата супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза способствует появлению у него новых качеств (антиагрегационной

активности при индуцированной агрегации тромбоцитов) и проявлению активностей его компонентов на высоком уровне (влияние СОД и каталазной активностей конъюгата на тонус сосудистого фрагмента, сходное с таковым у нативных биокатализаторов, вклад в антиагрегационный эффект биферментного конъюгата хондроитинсульфата), определяющих его наибольшее антиоксидантное действие среди различных сочетаний составляющих конъюгат компонентов (Максименко А.В., Ваваев А.В., Бурячковская Л.И., Мох В.П., Учитель И.А., Лакомкин В.Л., Капелько В.И., Тищенко Е.Г. Биофармакология ферментных конъюгатов: вазопротекторная активность супрамолекулярного производного супероксиддисмутазы-хондроитинсульфат-каталаза. *Acta Naturae*, 2010, том 2, № 4 (7), 90-103).

В качестве ремарок оппонента по представленной работе следует отметить у диссертанта проскальзывающую порой по тексту терминологическую нестрогость. Упоминающиеся острые заболевания (стр.10, 13) следует скорее отнести к острым поражениям и так их и называть. Выделение золотым стандартом терапии инсульта препаратов тканевого активатора плазминогена (стр. 13-14) довольно преждевременно, поскольку клинически показано его использование только в период 3,5 часов от начала поражения, только при ишемическом (а уж никак не геморрагическом) инсульте. Невнятно указание классификационных позиций Fe-СОД и внеклеточной СОД (стр. 22). Сегодня внеклеточная СОД (СОД-3) предстает гомотетрамерным гликопротеином. Он обладает высоким сродством к гепарансульфатам эндотелиального гликокаликса из-за наличия в молекуле фермента специфического положительно заряженного домена связывания гепарино-подобных структур (Marklund S.L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 7654-7638; Adachi T., Yamada Y., Morichara N. et al. Substitution of glycine for arginine-213 in extracellular superoxide dismutase impairs affinity for heparin and endothelial cell surface. *Biochem. J.*, 1996, 313, 235-239; Максименко А.В. Молекулярные аспекты трансляционной

кардиологии в исследованиях сосудистой стенки. Кардиология, 2017, 57, № 7, 64-77). В представленных материалах хотелось, конечно, видеть и наличие разрешительной документации для работы с кетаминот (стр. 48).

Сделанные примечания лишь подчеркивают достоинства рассматриваемого изучения. Среди них – аккуратный выбор модели поражения животных (с контролем силы повреждения и степени восстановления организма крыс после травмы и последующей экспериментальной терапии, стр. 17); стремление к достижению заметной экспозиции получаемых наночастиц, способствующей продуктивной нейтрализации СОД при экспериментах *in vivo* небольшого по размерам (диаметром 1,3 Å) супероксида (стр. 25-26); получение двухслойных наночастиц СОД с протамином, стабильно удерживающих ПГ-ПЭГ и отличающихся достаточно узким распределением по размерам (стр. 69). Заслуживает, конечно, благодарного упоминания наличие в библиографии диссертации, включающей 152 наименования, свыше 30 % публикаций последних шести лет (стр. 87-98). По материалам выполненного изучения получены три патента, опубликованы четыре статьи в рецензируемых научных журналах, 21 тезисное сообщение. Автореферат отражает основные результаты работы и гармонично соответствует содержанию диссертации. Представленные данные изложены ясным языком в весьма информативном и достаточно лаконичном стиле.

Совокупность результатов настоящего диссертационного изучения формирует теоретическую платформу для разработки и применения методов послойного создания наночастиц с различными ферментами. Научная новизна работы обусловлена и подтверждается эффективным использованием оптимизированного автором метода получения двухслойных наночастиц СОД, пригодных для последовательного биомедицинского исследования. Разработанные и реализованные при выполнении диссертационного изучения подходы отличает многоплановость рассмотрения, продуктивность конструирования действенных систем

доставки лекарств, высокий потенциал для работы с разнообразными ферментами. Достигнутые в исследованиях *in vivo* эффекты обосновывают значимую перспективу их дальнейшего развития, конкретно выделяя заметную практическую значимость формирования новых направлений антиоксидантной терапии с использованием бионанотехнологий.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Алексахин Антон Дмитриевич заслуживает присвоения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник отдела биоинженерных
технологий и поддержки научных исследований
Института Экспериментальной Кардиологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр кардиологии» Минздрава России

11.06.2021

Максименко Александр Васильевич _____

Контактные данные:

тел.: 7(495)4146025,

e-mail: labbiochemeng@cardio.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.0006.- «кардиология», 03.00.04 – «биохимия»

Адрес места работы:

121552, г. Москва, 3-тья Черепковская улица, д. 15А

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»

Минздрава России

Тел. : +7(495) 150-44-19

e-mail: info@cardioweb.ru

Подпись А.В. Максименко удостоверяю:

11.06.2021

Ученый секретарь ИЭК

ФГБУ «НМИЦ кардиологии»

МЗ РФ, доктор медици

Плеханова Ольга Серге