

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Будкиной Ольги Александровны

«Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки, 03.01.04 – биохимия, химические науки

Работа Будкиной О. А. представляет собой фундаментальное исследование, посвященное выявлению связей структурных параметров водорастворимых неионогенных амфифильных соединений блочного строения, с их биологическим действием на раковые клетки.

В литературе имеются сведения о различных биологических эффектах таких соединений *in vitro*. Часть сополимеров способны подавлять множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) раковых клеток, повышая эффективность химиотерапии, применение других помогает восстанавливать клетки от различного рода повреждений, и лишь для некоторых полимеров этой группы известно об их токсическом действии по отношению к клеткам (цитотоксичности). Однако, несмотря на столь разнообразный круг биологических эффектов амфифильных блок-сополимеров до сих пор не проводилось систематического изучения связи их строения и структуры с биологической активностью. Исследования в данной области могут быть основой для разработки и синтеза новых полимеров, обладающих желаемыми биологическими свойствами.

В этом отношении диссертационная работа Будкиной О.А., посвященная исследованию влияния структуры, химической природы и физико-химических свойств широкого круга амфифильных блок-сополимеров, а также углеводородсодержащих ПАВ на жизнеспособность и устойчивость к лекарствам раковых клеток, является вполне **актуальной** и, безусловно, обладает **научной новизной** и **практической значимостью**.

Особенность данной работы заключается в ее междисциплинарном характере. Именно поэтому защита данной диссертации проводится по двум специальностям – высокомолекулярным соединениям (химические науки) и биохимии (химические науки). При этом междисциплинарность подхода позволила Будкиной О. А. не только выяснить связь молекулярного строения амфифильных блок-сополимеров и их биологических эффектов на раковых клетках, но и дала возможность прояснить вероятные механизмы действия указанных соединений. Поэтому, на мой взгляд, защита данной работы по двум специальностям является вполне оправданной.

Работа построена традиционным образом: она включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, содержащую подробное описание объектов и методов исследования, часть, посвященную результатам работы и их обсуждению, заключение и список цитированной литературы.

Диссертация изложена на 135 страницах и включает 42 рисунка и 9 таблиц. Библиография состоит из 212 наименований литературных источников.

Во введении отражены актуальность работы, сформирована ее цель и задачи, отражены научная новизна, теоретическая и практическая ценность проведенных исследований.

В обзоре литературы диссертант рассмотрела синтез, основные структурные особенности и свойства исследованных соединений, их взаимодействие с модельными липидными мембранами, а также подробно изложила известные на сегодняшний день факты об их биологическом действии на живые клетки и о предполагаемых механизмах такого действия. Обращает на себя внимание значительное количество рассмотренных работ, опубликованных в последние годы, что позволяет судить о достаточно высоком умении диссертанта работать с литературой.

В экспериментальной части диссертант привела описание использованных в работе соединений и методов исследования. На одной и той же линии человеческих раковых клеток, устойчивых к лекарствам, исследовано 16 амфифильных соединений блочного строения, различающихся по химической природе и архитектуре блоков. Гидрофобный блок изученных соединений был представлен либо полипропиленоксидом (ППО), либо полидиметилсилоксаном, либо предельным углеводородом, а гидрофильный – либо полиэтиленоксидом (ПЭО), либо полиглицерином. Исследованные соединения различались также по архитектуре гидрофильного блока (линейный или разветвленный) и по степени блочности – двублочные и трехблочные. Основную группу рассмотренных соединений составили п्लороники – трехблочные сополимеры ППО и ПЭО, различающиеся по степени полимеризации блоков.

При выполнении диссертационной работы Будкина О.А. использовала современные методы анализа: флуоресцентная микроскопия, статическое светорассеяние, радиоавтография, методы работы с клеточными культурами.

Такой широкий набор современных экспериментальных подходов позволяет считать приведенные в работе результаты вполне **достоверными**.

Глава «Результаты и обсуждение» начинается с рассмотрения структуры, а также физико-химических свойств исследуемых соединений, а именно – гидрофильно-липофильного баланса и мицеллообразования. При этом в ходе исследования мицеллообразования диссертантом были использованы различные методы – анализ с

помощью флуоресцентного зонда и статическое светорассеяние – и проведено их сопоставление. Это подчеркивает фундаментальный подход автора к пониманию данного явления.

Основная часть главы посвящена изучению биологических эффектов амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ на раковые клетки и взаимосвязи этих эффектов с молекулярным строением изучаемых соединений и их способностью к мицеллообразованию.

Для этого О.А. Будкина исследовала цитотоксичность амфифильных блок-сополимеров. При сопоставлении этого свойства с мицеллообразованием сополимеров, оказалось, что токсичность большей части изученных соединений по отношению к клеткам в культуре обусловлена действием их мицелл, а не отдельных молекул. Следует подчеркнуть, что данная закономерность была показана впервые. Сопоставление цитотоксических концентраций сополимеров и величин их гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) позволило автору обнаружить эмпирическую зависимость между этими параметрами, показывающую, что, чем выше значение ГЛБ неионогенного амфифильного блок-сополимера, тем он менее токсичен. Данная зависимость была использована автором для теоретического анализа цитотоксичности блочных и привитых сополимеров полипропиленоксида и декстрана. Результаты такого расчета оказались близки экспериментально полученным. Таким образом, была найдена эмпирическая зависимость для прогнозирования области цитотоксических концентраций, справедливая не только для линейных неионогенных блок-сополимеров, но и для макромолекул, имеющих архитектуру молекулярных щеток. Практическая ценность этого результата заключается также и в значительном упрощении и сокращении экспериментальной работы по исследованию цитотоксичности таких соединений.

Полученные результаты, а также данные литературы позволили автору выдвинуть гипотезу, объясняющую механизм цитотоксичности амфифильных блок-сополимеров. Согласно данной гипотезе, присоединение мицеллы полимера к наружной мембране клетки приводит к деформации липидного бислоя вплоть до образования сквозных отверстий в мембране, через которые могут вытекать водорастворимые белки, приводя к гибели клетки.

Исследование цитотоксичности в широком диапазоне концентраций амфифильных блок-сополимеров позволило обнаружить неожиданное и интересное свойство этих соединений: в определенном интервале концентраций большинство сополимеров способствовало возрастанию количества живых клеток выше контрольного уровня. Ранее данный эффект был известен лишь для наиболее гидрофильных плуроников и использовался для защиты и восстановления клеточных мембран при различных повреждениях. Однако, автору удалось

показать, что данным биологическим свойством обладают и более гидрофобные плуроники, которые предлагаются сегодня в качестве компонентов противоопухолевых препаратов. В связи с этим, обнаруженный в настоящей работе эффект может иметь большое значение в случае медицинского применения таких сополимеров. Результаты систематического исследования показали, что приросту клеток способствовали не только плуроники, но другие амфифильные блок-сополимеры, например, сополимер полиэтиленоксида и полидиметилсилоксана. Отличительной чертой всех соединений, обладающих данным свойством, было наличие линейного гидрофильного блока, состоящего из звеньев полиэтиленоксида. При этом, оказалось, что чем больше степень полимеризации ПЭО, тем меньше концентрация полимера, вызывающая этот эффект. В отличие от ПЭО-содержащих соединений, другие сополимеры, гидрофильный блок которых - разветвленный полиглицерин, ни в одном из экспериментов не приводили к увеличению количества живых клеток. Эти результаты привели автора к выводу о том, что химическая природа и архитектура именно гидрофильного блока определяют эффект увеличения выживаемости клеток.

В работе обсуждается вероятное объяснение столь необычного влияния амфифильных блок-сополимеров на клетки. Автор предполагает, что при взаимодействии ПЭО-содержащего сополимера с наружной клеточной мембраной происходит образование водородных связей между кислородами ПЭО-звеньев и водородами гидроксильных групп многочисленных олигосахаридов, образующих на поверхности мембраны сеть, называемую гликокаликсом. В результате такого кооперативного взаимодействия на поверхности клетки формируется слой из молекул полимера. Этот слой, вероятно, и защищает клетку от неблагоприятных внешних воздействий, способствуя повышению ее жизнеспособности. В отличие от ПЭО-содержащих блок-сополимеров, в сополимерах полиглицерина образование водородных связей происходит главным образом между звеньями разветвленного полиглицеринового блока, и в этом случае взаимодействие с гликокаликсом невыгодно. Однако, данные предположения требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

Одним из основных направлений в работе является исследование влияния полимеров на цитотоксичность доксорубина в раковых клетках, проявляющих множественную лекарственную устойчивость (МЛУ). Следует отметить, что для этого автор использовал новую постановку опыта, позволяющую определить оптимальную концентрацию сополимера, необходимую для максимального подавления МЛУ. В результате применения этой методики, было обнаружено, что все исследованные соединения способны снижать устойчивость клеток к лекарствам. При этом подавляющее большинство сополимеров действовало в виде отдельных молекул. Исключение составили лишь наиболее

гидрофильные плуроники, эффект которых проявлялся лишь при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования. Найденные оптимальные для подавления МЛУ концентрации сополимеров коррелировали со способностью тех же соединений разупорядочивать липидный бислой модельных мембран. Указанная способность в свою очередь коррелировала с такими параметрами, как общая гидрофобность блок-сополимера и объем его гидрофобного блока. На основании этих данных диссертантом был сделан вывод о том, что именно эти параметры блок-сополимеров определяют их способность подавлять МЛУ раковых клеток. Предложенное автором вероятное объяснение такой взаимосвязи «структура-свойство» исходит из того, что устойчивость использованных в работе раковых клеток обусловлена действием трансмембранного белка Р-гликопротеина, выбрасывающего лекарство из клеток. Возмущение липидного микроокружения этого белка, вызываемое амфифильным блок-сополимером, приводит к ингибированию его работы и, как следствие, повышает вероятность накопления лекарства внутри клетки.

Все предложенные в работе гипотезы о механизмах биологического действия амфифильных блок-сополимеров на клетки предполагали взаимодействие полимеров с наружной клеточной мембраной клетки. Для проверки этого предположения в работе была изучена локализация блок-сополимеров при их взаимодействии с клетками (заключительная глава диссертации). Это исследование было проведено с использованием двух разных методик. Первая методика, наиболее часто используемая в опубликованных работах, заключалась в мечении исследуемых соединений флуоресцентной меткой – флуоресцеином, вторая – радиоактивными атомами трития. Следует отметить, что практически нет данных литературы об использовании последнего способа мечения полимеров для решения такой задачи. В то же время разносторонний подход позволил автору обнаружить, что тип метки играет немаловажную роль. В работе был проведен тщательный анализ такого влияния на примере широко используемого для этих целей флуоресцеина. Оказалось, что присоединение флуоресцеина к блок-сополимерам существенно сказывается на физико-химических и биологических свойствах получаемых конъюгатов. Более того, благодаря наличию ионогенных групп флуоресцеин способен связываться с митохондриальными белками - переносчиками отрицательно заряженных кислот и проникать в митохондрии. В связи с этим автор полагает, что обнаружение флуоресцеин-меченых сополимеров внутри клеток, вероятно, обусловлено сродством метки к внутриклеточным органеллам.

В то же время известно, что введение трития практически не влияет на свойства получаемых конъюгатов. Результаты исследования тритий-меченых соединений методом радиоавтографии показали, что полимеры локализуются преимущественно на наружной мембране клеток, хотя, автор признает, что особенности метода не позволяют полностью

исключить проникновение полимеров внутрь клеток. Тем не менее, диссертант полагает, что метод радиоавтографии корректнее в сравнении с мечением флуоресцеином. В связи с этим, на основании результатов исследования тритий-меченых полимеров, в работе сделан вывод о том, что взаимодействия амфифильных блок-сополимеров с наружной мембраной клеток может быть достаточно для проявления их биологических свойств.

Все изложенное позволяет сформулировать положения, характеризующие **научную новизну** рецензируемой диссертации:

- в отличие от низкомолекулярных ПАВ, все исследованные блок-сополимеры только в мицеллярной форме вызывают гибель клеток;

- цитотоксическая концентрация неионогенного амфифильного блок-сополимера определяется массовой долей гидрофильного блока (ГЛБ): чем гидрофильнее полимер, тем он менее токсичен;

- впервые показано, что способность неионогенных блок-сополимеров увеличивать выживаемость клеток определяется молекулярной структурой гидрофильного блока и химической природой его звеньев;

- впервые обнаружено, что общая гидрофобность макромолекулы блок-сополимера и объем его гидрофобного блока обуславливают способность подавлять устойчивость раковых клеток к противоопухолевому препарату доксорубицину.

Практическая значимость работы определяется тем, что найденная зависимость между ГЛБ неионогенного амфифильного блок-сополимера и его цитотоксичностью может быть использована для прогнозирования области цитотоксических концентраций блок-сополимеров, что позволяет сократить объем работ для их экспериментального определения.

Разработан новый методический прием определения концентрации водорастворимого амфифильного неионогенного блок-сополимера, оптимальной для подавления лекарственной устойчивости раковых клеток. Данный способ отличается высокой точностью по сравнению с описанными в литературе и менее трудоемок.

По работе Будкиной О. А. можно сделать следующие замечания.

1. Хотелось бы услышать, насколько применимы интересные закономерности, полученные автором в рядах амфифильных простых полиэфилов блочного строения, к блок-сополимерам другого химического строения или макромолекулярной архитектуры.
2. В диссертации отсутствуют объяснения, почему для увеличения количества живых клеток требуются более высокие концентрации плороников L61, P85, P123, чем для подавления лекарственной устойчивости (таблица 8), тогда как для гидрофильных плороников эта закономерность носит обратный характер.

3. Не подвергая сомнению результаты исследования действия различных амфифильных соединений на раковые клетки, проведенные на культуре клеток *in vitro*, можно выразить сожаление, что в работе отсутствуют данные о действии тех же соединений *in vivo*. Наличие таких данных существенно повысило бы ценность работы для создания реальных средств для лечения рака.
4. Автор обнаруживает связь между физиологическим действием полимеров и ГЛБ полимеров. Однако, молекулярный механизм этого эффекта обсуждается недостаточно четко.
5. Не достаточно изучен клеточный транспорт (внутри и наружу) доксорубина и плуроников.

Сделанные замечания не снижают общего хорошего впечатления от работы.

Выводы, сформулированные диссертантом, корректны и непротиворечивы.

Диссертация и автореферат хорошо оформлены.

Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждена также публикацией научных результатов диссертационной работы Будкиной О. А. в двух научных статьях, из них 1 статья опубликована в научном журнале из перечня Высшей аттестационной комиссии российских рецензируемых научных журналов, и 1 статья опубликована в рецензируемом научном журнале, индексируемом по базе Web of Science.

По своему содержанию, объектам и методам исследования диссертация Будкиной О. А. соответствует п. 9 паспорта специальности 02.00.06 – «Высокомолекулярные соединения» (химические науки) и п. 14 паспорта специальности 03.01.04 – «Биохимия» (химические науки).

Диссертационная работа Будкиной О. А. «Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки» является цельной законченной научно-квалификационной работой, которая по своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.13 № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, поскольку в ней предложено решение задач, имеющих существенное значение для междисциплинарных исследований в области биохимии и химии высокомолекулярных соединений, а именно: показано, что амфифильные блок-сополимеры вызывают три различных биологических

эффекта в зависимости от концентрации, которая, в свою очередь, определяется химическим строением макромолекулы.

Официальный оппонент,
доктор химических наук, профессор
кафедры «Химия и технология
высокомолекулярных соединений»
Московского государственного университета
тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова
Зубов Виталий Павлович
Тел.: 8-903-252-47-92
E-mail: zubov@ibch.ru
Почтовый адрес организации:
119571, г. Москва, пр. Вернадского, д.86



Зубов В. П.

Подпись Зубова В.П. удостоверяю
«29» мая 2015 г.

ученый секретарь диссертационного совета А 212.41.05

Трещина / Трещина /

