

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу
Екатерины Дмитриевны МАКСИМОВОЙ
«Катионные наногели: синтез, свойства и использование
для транспорта нуклеиновых кислот в живые клетки»,
представленную к защите на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальностям
02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические
науки, и 03.01.04 – биохимия, химические науки

Исследование и использование высокомолекулярных соединений для совершенствования диагностических приемов и терапевтических средств медицины составляет одно из значимых и современных направлений её развития. Перспективным для повышения эффективности лечения оказалась направленная/нацеленная доставка средств коррекции метаболизма к достоверно определенным мишеням очага поражения. Среди изучаемых и разрабатываемых подходов заметен высокий интерес к доставке в клетки нуклеиновых кислот (НК) и их производных. Развитие этого направления ассоциировано с прогрессом генной терапии, для чего ведутся интенсивные поиск и изучение систем нацеленной доставки и эффективных носителей, обеспечивающих попадание олигонуклеотидов в требующие лечебной или профилактической помощи клетки. В качестве отмеченных носителей весьма действенными предстали катионные гидрогелевые частицы микро- и наноразмеров. Продуктивность их биомедицинского изучения и применения во многом определялась макромолекулярной структурой этих объектов, обнаруживая растущий интерес исследователей к дендримерам, разветвленным и сетчатым полимерам. Актуальности исследуемой проблемы отвечает диссертационная работа Е.Д. Максимовой, систематически и последовательно изучающей влияние структуры наногелевых частиц на основе поликатионов на взаимодействие с

полианионами (включая и нуклеиновые кислоты) и на эффективность доставки ДНК и их производных в живые клетки. Важность представленной к защите диссертационной работы опирается на экспериментальное определение закономерностей взаимосвязи структурных особенностей катионных наногелевых частиц с их взаимодействием с полианионами и эффективностью трансфекции ДНК и её производных с помощью выбранных объектов исследования в живые клетки.

Настоящая диссертационная работа изложена на 127 страницах машинописного текста и включает 39 черно-белых и цветных рисунков, одну таблицу. Библиография диссертации состоит из 167 наименований ссылок литературы на упомянутые источники. Диссертация имеет традиционное построение и содержит разделы/главы: Введение, Обзор литературы, Экспериментальная часть, Результаты и их обсуждение, Выводы, Список использованной литературы.

Обзор литературы вполне лаконичен и достаточно информативен. Он касается методов получения наногелей, их практического применения, и аспектов доставки нуклеиновых кислот в клетки (стр. 9-50). Аргументировано автор обосновывает важность для продуктивного использования наногелей размера их частиц, его узкого распределения и степени сшивания, определяемой, во многом, концентрацией сшивающего агента (сшивателя). Анализ представленного материала определяет выбор диссертантом в качестве перспективного метода получения наногелей – обратную микроэмульсионную полимеризацию (стр. 26). Этот метод позволяет получать частицы небольших размеров, с их узким распределением и возможностью варьирования степени сшивки наногелей посредством изменения мольной доли сшивателя. В качестве успешного примера для практики упоминается перешитый тиолированной гиалуроновой кислотой нангель, предназначенный для регенерации голосовых связок ([58], стр. 30). Обзор литературы демонстрирует разнообразное применение наногелей - как носителей биокатализаторов, для инженерии тканей,

доставки лекарств и нуклеиновых кислот. Аналитическое рассмотрение вопроса доставки НК в клетки с помощью невирусных носителей четко обнаруживает проблемные аспекты выбранного направления изучения: деструктирующее воздействие на НК в составе наноконплексов вне- и внутриклеточных нуклеаз; возможная адсорбция наноконплексами отрицательно заряженных белков крови (альбумина, фибриногена, иммуноглобулинов и др.), приводящая к агрегации частиц; затруднения перехода частиц через клеточную мембрану посредством эндоцитоза, определяющего оптимальный размер частиц для этого в 100 – 150 нм; выход наноконплексов и их компонентов из эндосом; попадание НК в клеточное ядро. Обобщение приведенных данных позволяет автору обоснованно указать возможность регуляции устойчивости ДНК-содержащих конплексов посредством длины, плотности заряда и структуры поликатиона (стр. 44). Важно подчеркнуть, что структурное разветвление поликатиона способствует значительному повышению эффективности осуществляемой им трансфекции (стр. 50). На основе выполненного анализа данных литературы соискателем обоснованно определяется выбранное направление диссертационного изучения – исследование влияния сетчатой структуры катионных наногелей на их взаимодействие с полианионами, клетками и на транспорт в них плазмидной ДНК и короткой интерферирующей РНК.

Экспериментальная часть изложена достаточно подробно (стр. 51-65), способствуя практическому воспроизведению полученных в диссертационной работе данных.

Приведенные результаты изучения убедительно показали эффективность эмульсионной полимеризации в системе обращенных мицелл, образуемых олеилдекаэтиленгликолем (BrijO10), для получения исследуемых наногелей. Отмечено узкое распределение частиц по размерам при концентрации сшивателя (метиленабисакриламида, МБА) более 5 % (рис. 19,б, кривая 1, стр. 69). Резкое снижение индекса полидисперсности наблюдалось при увеличении концентрации МБА с 1 до 4 % (мол.). В целом,

разработанный метод синтеза наногелей позволяет продуктивно получать в одну стадию наночастицы, отвечающие требованиям, предъявляемым для носителей НК (стр. 71). При этом размер недоступной для полианиона зоны в частице наногеля уменьшается с ростом концентрации сшивателя (рис. 25, стр. 76).

К достоинствам изучения следует отнести обнаружение весьма высокой стабильности комплексов наногелей с ДНК (рис. 32, стр. 90). Этот эффект проявлялся как в реакциях полиэлектролитного обмена, так и в устойчивости против действия нуклеаз (ДНКазы I, рис. 34). Повышение степени сшивки наногелей (до 12 и 15 %) резко усиливало их защитный эффект в отношении ДНК (стр. 91).

Весьма обещающе и довольно перспективно выглядит найденное уменьшение цитотоксичности наногелей в сравнении с линейным полимером поли-N,N'-диметиламиноэтилметакрилатом (ПДМАЭМА, рис. 35, стр. 93). Конечно, эти данные не освобождают от необходимой оценки острой и хронической токсичности препарата, но и, вместе с тем, подтверждают важность и своевременность его дальнейшего исследования.

Более того, было показано, что сетчатые поликатионы эффективнее доставляют плазмидную ДНК в живые клетки по сравнению с линейным полимерным аналогом (стр. 94, рис. 36,а). Интересно отметить, что положение максимума трансфекционной активности соответствует содержанию сшивающего агента, при котором частицы комплексов с ДНК имеют наименьший размер. Приведенные выше данные и положения настоящей работы отличает высокая научная обоснованность благодаря использованию современных методов исследования междисциплинарного характера, глубокому и обширному анализу данных исследовательских публикаций.

Наряду с этим, в представленном диссертационном изучении имеется несколько дискуссионных моментов, заслуживающих быть отмеченными.

Использование метода эмульсионной полимеризации в системе обращенных мицелл позволяет достичь уменьшения размера частиц (в интервале концентрации МБА 0,2 – 15 %, рис.19,б, кривая 1, стр. 69) и существенного сужения их распределения по размерам (рис.19,б, кривая 2, стр. 69). Автор предполагает, что этот результат обусловлен сшиванием нескольких, растущих внутри водной полости одной мицеллы цепей в одну макромолекулу (стр. 70, рис. 20). Это положение уточняется подтверждающими данными атомно-силовой микроскопии (стр. 70-71, рис. 21). На мой взгляд, в этом случае целесообразнее говорить о плотности сшивания для однозначной ясности трактования полученных данных. Использование здесь единой терминологии устраняет другие определения, приводимые в работе (снижение индекса полидисперсности – стр. 70, степень сшивки – стр. 88, плотность сшивки – стр. 91), и придает ей большую четкость. Кроме того, образование одной сшитой макромолекулы в одной мицелле (с достаточно узким распределением образованных частиц по размерам) обоснованно ставит вопрос (пропущенный в материалах диссертации): каково распределение по размерам самих мицелл используемой системы? Приведение и использование таких данных, несомненно, послужит повышению надежности интерпретации полученных результатов и их развитию.

Обращает внимание рассуждение диссертанта о возможности взаимодействия линейного ПДМАЭМА на поверхности клеток с гиалуроновой кислотой или синдеканами (стр. 100) с образованием полиэлектролитных комплексов, захватываемых клетками. При этом упомянутые компоненты наружного клеточного окружения (в слое гликокаликса) способствуют ионизации свободных аминогрупп поликатиона и снижают его буферное действие. В результате у линейного ПДМАЭМА теряются эндосомодеструктурирующие свойства. Заявленное положение требует пояснения и дополнительных сведений, - как связанные (закрепленные на мембране) в составе клеточного гликокаликса гиалуронан,

синдеканы проникают внутрь клетки или как-то иначе направляют туда линейный поликатион. В настоящее время показано, что при развитии ряда патологий наблюдается увеличение содержания в крови гиалуронана и синдеканов (Padberg J.S., Wiesinger A., di Marco G.S., Reuter S., Grabner A., Kentrup D., Lukasz A., Oberleithner H., Pavenstadt H., Brand M., Kumpers P. Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. *Atherosclerosis*, 2014, 234 (2): 335-343). Нарушение регуляции синтеза / деградации / связывания гиалуронана характерно для случаев рака молочной железы (Heldin P., Basu K., Olofsson B., Porsch H., Kozlova I., Kahata K. Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J. Biochem.*, 2013, 154 (3): 395-408), а увеличение фрагментов гиалуронана низкой молекулярной массы сопровождает процесс метастазирования при этом (Wu M., Cao M., He Y., Liu Y., Yang C., Du Y., Wang W., Gao F. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. *FASEB J.*, 2015, 29 (4): 1290-1298). Вероятно, увеличение внеклеточного содержания фрагментов гиалуронана может повлиять на эффекты линейного поликатиона. Данных о рассмотрении таких взаимодействий в материалах диссертационной работы не имеется. По моему мнению, высказанное предположение весьма зыбко и требует дополнительного анализа и внятного комплементарного теоретико-экспериментального разъяснения.

Представленная диссертационная работа весьма аккуратно оформлена, четко и лаконично изложена, последовательно строго составлена. Порой все-таки, к сожалению, в предложенном материале встречаются неточности и погрешности. Так, на стр. 69 целесообразно указать рассматриваемый Рис. 19,а и б; на рисунке 5 автореферата перепутано обозначение доступной и недоступной для полианиона зон; при осмотическом набухании происходит скорее разрыв, а не лизис эндосом (подпись к Рис. 12 на стр. 19 автореферата). Имеются опечатки в тексте диссертации (стр. 45, 85, 99, 103), неудачные выражения («ограничения разворачивания... развернутой конформации», стр. 73), а иногда и «жаргонизмы» (стр. 104).

В общем, настоящее диссертационное изучение представляет интересное и глубокое междисциплинарное исследование, выполнение которого привело к получению значимых и перспективных результатов. Установлена роль сетчатой структуры поликатионного наногеля в повышении эндосомодеструктурирующих свойств слабых полиаминов. Отмеченный в исследовании эффект был связан с наличием в частицах наногелей зон с недоступными, для ионных взаимодействий с полианионами, аминогруппами, способствующими развитию эффекта осмотического набухания и разрушения эндосом в клетках. Наибольшую трансфекционную активность проявляли наногели с промежуточным содержанием сшивающего агента (около 2 %), формирующие комплексы с ДНК и малой интерферирующей РНК наименьшего размера. Таким образом, сетчатая структура поликатионов выступает важным фактором действенного повышения эффективности доставки нуклеиновых кислот и их производных в живые клетки. Автореферат отражает основные результаты выполненного диссертационного изучения. Они интересны и могут быть использованы в работах исследовательских организаций, занимающихся изучением доставки ДНК и её производных в живые клетки, – в Институте биологии гена, НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Московском технологическом университете (все – Москва), ФГБУ «НИИ биохимии» в Новосибирске и других.

Высказанные в работе (стр. 107) перспективы её дальнейшего развития экспериментально обоснованы и важны. Сделанные на основе проведенного диссертационного изучения выводы последовательно аргументированы и надежны. Научная новизна исследования заключается в разработке метода получения узкодисперсных гидрогелевых частиц радиусом 25-50 нм, пригодных для образования полиэлектролитных комплексов с ДНК и её производными и способных обеспечить эффективный транспорт названных агентов в живые клетки. Практическая значимость работы опирается на установленные эффекты сетчатой структуры поликатионных наногелей,

обуславливающей повышение на порядок эффективности их трансфекционной активности и использование предложенного подхода для конструирования эффективных поликатионных носителей для генной или клеточной терапии.

Итак, по актуальности темы диссертационной работы, объему полученных в ней экспериментальных данных, их новизне и практической значимости, надежности сделанных выводов, перспективности и обоснованности приведенных рекомендаций можно заключить, что настоящая диссертация отвечает требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а сам диссертант, Екатерина Дмитриевна Максимова, заслуживает, по моему мнению, присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки, и 03.01.04 – биохимия, химические науки.

« 16 » марта 2016 года

Официальный оппонент доктор биологических наук, профессор, отдел биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии, ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а
E – mail address: alexmak@cardio.ru
Тел.: (495) 414-60-25



А.В. Максименко

Подпись профессора А.В. Максименко заверяю

Ученый секретарь
Института экспериментальной кардиологии,
ФГБУ Российский кардиологический
научно-производственный комплекс
Министерства здравоохранения Российской Федерации



С.А. Левашова

Сведения об официальном оппоненте

по диссертации Максимовой Екатерины Дмитриевны
«Катионные наногели: синтез, свойства и использование для транспорта нуклеиновых кислот в живые клетки» по специальностям 02.00.06 - высокомолекулярные соединения, химические науки, 03.01.04 – биохимия, химические науки
на соискание ученой степени кандидата химических наук

Фамилия, имя, отчество	Максименко Александр Васильевич
Гражданство	РФ
Ученая степень (с указанием шифра специальности научных работников, по которой защищена диссертация)	Доктор биологических наук 14.00.06 – кардиология, 03.00.04 – биохимия, биологические науки
Ученое звание (по кафедре, по специальности)	профессор
Место работы	
Почтовый индекс, адрес, web-сайт, электронный адрес организации	121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а, http://www.cardioweb.ru/ , info@cardioweb.ru
Полное наименование организации соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Должность	Ведущий научный сотрудник отдела биоинженерных технологий и поддержки научных исследований Института экспериментальной кардиологии
Публикации по специальности 03.01.04 – биохимия, химические науки (4-5 публикаций за последние 5 лет, в том числе обязательно указание публикаций за последние 3 года):	
1. Maksimenko A.V., Turashev A.D., Beabealashvili R.S. / Stratification of chondroitin sulfate binding sites in 3D-model of bovine testicular hyaluronidase and effective size of glycosaminoglycan coat of the modified protein. // Biochemistry (Moscow), 2015, V. 80, № 3, P. 284 – 295. Импакт-фактор 1,301	
2. Максименко А.В., Турашев А.Д. / Эндотелиальный гликокаликс системы кровообращения. II. Биологические функции, состояние в норме и патологии, биоинженерное использование (Обзорная статья). // Биоорганическая Химия, 2014, Т. 40, № 3, С. 259 – 274. Импакт-фактор 0,587	
3. Максименко А.В., Турашев А.Д. / Эндотелиальный гликокаликс системы кровообращения. I. Обнаружение, компоненты, структурная организация (Обзорная статья). // Биоорганическая Химия, 2014, Т. 40, № 2, С. 131 – 141. Импакт-фактор 0,587	
4. Ваваев А.В., Бурячковская Л.И., Тищенко Е.Г., Учитель И.А., Максименко А.В. / Антиоксидантное и антиагрегационное действие ковалентного биферментного конъюгата супероксиддисмутазы-хондроитинсульфат-каталаза на тромбоциты. // Биомедицинская химия, 2012, Т. 58, № 3, С. 300 – 309. Импакт-фактор 0,27	
5. Турашев А.Д., Тищенко Е.Г., Максименко А.В. / Определяют ли электростатические взаимодействия гликирование гиалуронидазных производных N-ацетилгексозаминами? // Биомедицинская химия, 2011, Т. 57, № 6, С. 624 – 634. Импакт-фактор 0,27	

Официальный оппонент

А.В. Максименко

Верно

подпись

С.А. Левашова

Ученый секретарь Института

подпись

Экспериментальной
кардиологии

«18» август 2016 г.