

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор

федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
профессионального образования

«Московский государственный университет  
тонких химических технологий  
имени М.В.Ломоносова»

доктор технических наук, профессор



А.К.Фролкина

« 11 » ноября 2014 г.

### ОТЗЫВ

ведущей организации, федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова», на диссертационную работу Заборовой Ольги Владимировны «Комплексы катионных полимерных микросфер с отрицательно заряженными липосомами: формирование, строение и свойства», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки

Бислойные липидные везикулы (липосомы) получили широкое распространение в качестве наноразмерных контейнеров для инкапсулирования и последующего высвобождения биологически активных (лекарственных) веществ. Традиционный подход, в котором роль контейнеров выполняют индивидуальные липосомы, сформированные из смеси липидов или липидоподобных соединений, оказался весьма плодотворным и позволил повысить растворимость и биологическую доступность плохо растворимых в воде лекарств, увеличить время их циркуляции в кровотоке, защитить лекарства от побочного расходования в результате биодegradации, повысить эффективность захвата лекарства целевыми клетками. Вместе с тем ряд принципиальных вопросов остаются нерешенными. К ним относятся ограниченная емкость традиционных липосомальных контейнеров диаметром около 100 нм, проблемы с созданием многокомпонентных лекарственных препаратов для комплексной терапии, медленное высвобождение лекарства в зоне терапевтического действия.

В диссертационной работе О.В. Заборовой рассматривается формирование, строение и свойства комплексов, полученных путем электростатической адсорбции анионных липосом на поверхности полистирольных микросфер с привитыми поликатионными цепями

(«сферических поликатионных щеток»). Такой прием позволил автору сконцентрировать в небольшом объеме несколько десятков липосом, заполненных различными гидрофильными и гидрофобными наполнителями. Использование рН-чувствительных липосом привело к получению мультилипосомального контейнера, способного быстро высвобождать содержимое в слабокислой среде, характерной для воспаленных тканей и опухолей. Полученные О.В. Заборовой результаты составляют основу методологии деликатной (без разрушения) иммобилизации «мягких» объектов (липосом, мицелл, наногелей, поликомплексов) на твердой поверхности и представляют очевидный интерес для разработки нового поколения липосомальных лекарств. Сказанное выше говорит об актуальности и практической значимости работы О.В. Заборовой.

Диссертационная работа О.В. Заборовой построена по традиционному плану и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части с описанием материалов и методов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы.

В Литературном обзоре автор рассматривает строение и физико-химические свойства бислойных липидных мембран, методы получения сферических бислойных везикул (липосом), применение липосом для доставки лекарственных веществ и нерешенные проблемы в этой области. Специальный раздел посвящен описанию свойств электростатических комплексов между противоположно заряженными липосомами и линейными полиэлектролитами и структурным перестройкам, вызываемым в липосомальной мембране адсорбированными полиэлектролитами. Обзор охватывает широкий круг вопросов мембранологии и физической химии полимеров, написан хорошим языком и достаточно полно отражает состояние дел в данной области.

В Экспериментальной части перечислены использованные в работе амфифильные вещества (липиды, ПАВы и полимеры) и описаны способы получения липосом, поликатионных щеток и полипептидных везикул. Эта часть содержит описание методов исследования физико-химических свойств полимер-коллоидных систем – традиционных (микроэлектрофорез, светорассеяние, флуориметрия, кондуктометрия и проч.) и менее распространенных, но весьма информативных, таких как дифференциальная сканирующая калориметрия и криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ПЭМ). Здесь же приведена методика оценки цитотоксичности полученных мультилипосомальных контейнеров. Эта часть работы изложена четко и понятно и дает представление о высоком методическом уровне поставленных экспериментов.

Полученные автором результаты сгруппированы в шесть разделов (частей). В первой части автор подробно исследует адсорбцию малых монослоев анионных липосом диаметром около 50 нм на поверхности поликатионных щеток. Липосомы готовили из смеси

(а)нейтрального фосфатидилхолина (ФХ), и (б)анионного дифосфатидилглицерола (кардиолипина,  $КЛ^{2-}$ ) или фосфатидилсерина ( $ФС^{1-}$ ). Показано, что липосомы количественно связываются с поликатионными щетками. Максимальное количество липосом, которое может быть адсорбировано на одной поликатионной щетке, уменьшается по мере возрастания доли анионного липида в липосомальной мембране ( $v$ ): с 40 для липосом с  $v = 0.1$  до 13 для липосом с  $v = 0.5$ . Целостность адсорбированных липосом определяется мольной долей анионного липида и геометрией липидных молекул: для  $КЛ^{2-}$ , молекулы которого имеют форму усеченного конуса, целостность липосом сохраняется при  $v \leq 0.3$ , для цилиндрических по форме молекул  $ФС^{1-}$  при  $v \leq 0.5$ . Принципиальный вывод о сохранении целостности адсорбированных липосом подкреплен результатами визуального эксперимента с помощью криогенной микроскопии. Комплексы щеток и липосом с  $v \geq 0.2$  сохраняют стабильность (не диссоциируют на исходные компоненты) в физиологическом растворе с  $[NaCl] = 0.15$  М.

Во второй части автор обсуждает структурные перестройки в липосомальных мембранах, индуцированные адсорбцией липосом на поверхности щеток. Адсорбция липосом сопровождается переходом анионных липидов с внутренней стороны липосомальной мембраны на внешнюю (флип-флопом) и микрофазовым разделением липидов в мембране. Полное разделение на два типа доменов, состоящих из нейтральных липидных молекул и анионных липидных молекул, связанных в комплекс с катионными щетками, наблюдается только в липосомах с малым содержанием анионного липида. Увеличение доли анионного липида в адсорбированных липосомах приводит к «размыванию» границы между нейтральными и анионными доменами и формированию смешанных доменов с участием липидов обоих типов.

Результаты электрофоретических и калориметрических исследований позволили автору предложить модель для описания той роли, которую играют привитые поликатионные цепи в сохранении целостности адсорбированных липосом: поликатионный слой с высокой плотностью привитых цепей прочно связывает анионные липосомы на поверхности носителя и в то же время препятствует непосредственному контакту липосом с жесткой поверхностью полистирольного ядра.

В третьей части описаны мультилипосомальные контейнеры, содержащие липосомы с различными наполнителями: (1)гидрофильным, (2)гидрофобным и (3)гидрофильным с гидрофобным якорем. Такие конструкции получаются путем смешения суспензии щеток и смеси липосом с требуемым соотношением инкапсулированных веществ. В таком же соотношении липосомы адсорбируются на поверхности носителя. Как отмечалось выше, сформированный таким образом мультилипосомальный комплекс устойчив в

физиологическом растворе, что открывает путь к простой технологии получения многофункциональных биологически активных конструкций.

Четвертая часть содержит методику получения электростатических комплексов поликатионных щеток и рН-чувствительных липосом. Такие комплексы высвобождают заключенное в липосомы вещество при понижении рН окружающего водного раствора с 7 до 5. Скорость выхода инкупсулированного вещества из мультилипосомальных комплексов существенно превышает скорость его выхода из индивидуальных (не связанных в комплекс) липосом. Описанный прием может быть использован для получения мультилипосомальных лекарственных форм, что позволяет надеяться на заметное повышение эффективности действия вводимого лекарства.

В короткой пятой части приведены данные по цитотоксичности комплексов поликатионных щеток с липосомами. Как и следовало ожидать, цитотоксичность поликатионных щеток заметно превышает цитотоксичность анионных липосом. Однако формирование слоя липосом на поверхности щеток понижает их цитотоксичность. Конечный результат зависит от того, насколько заряд щеток нейтрализован зарядом адсорбированных липосом. Комплексы с избыточным отрицательным зарядом демонстрируют цитотоксичность близкую к таковой для исходных липосом. Полученные результаты следует принимать во внимание при формировании электростатических мультилипосомальных контейнеров для биомедицинского применения.

В последней шестой части описаны результаты экспериментов, в которых анионные липосомы были связаны в комплекс с везикулами, сформированными из блок-сополимерного полипептида. В таком полимере один блок был представлен электронейтральным (гидрофобным) полилейцином, второй – катионным полиаргинином. Аналогично поликатионным щеткам полипептидные везикулы формировали с анионными липосомами комплексы, в которых липосомы сохраняли свою целостность; полученные комплексы не диссоциировали на исходные компоненты в физиологическом растворе. Основное отличие полученных комплексов заключалось в том, что полипептидный носитель подвергался гидролизу в присутствии протеолитического фермента трипсина.

Эти результаты автор рассматривает как предварительные, они не вынесены в виде отдельного пункта в выводы диссертации. Между тем, они представляют особый интерес, поскольку биодegradируемость носителя означает биодegradируемость и всего комплекса, что делает его перспективным в качестве мультилипосомальной лекарственной формы.

Суммируя результаты работы, можно выделить следующие основные достижения автора: использование сферических поликатионных щеток и катионных полипептидных везикул для электростатической иммобилизации анионных липосом, исследование свойств

полученных комплексов, в том числе их устойчивости в водно-солевых растворах, получение мультилипосомальных комплексов с наполнителями различной природы и описание механизма формирования и функционирования комплексов поликатионных щеток с рН-чувствительными липосомами.

Диссертация включает описание всех методов, использованных автором при выполнении диссертационной работы. Работа выполнена на очень высоком методическом уровне с использованием современных экспериментальных физико-химических и биологических методов. Четкое изложение методик позволяет в полной мере анализировать и воспроизводить результаты, полученные автором.

Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенного исследования и представляются в полной мере обоснованными.

Список литературы содержит оригинальные статьи, а также литературные обзоры и монографии, посвященные свойствам липосом и их комплексов с катионными полимерами.

Достоверность полученных результатов обусловлена квалифицированным применением современных методов, тщательностью проведения экспериментов, грамотной обработкой и корректной интерпретацией результатов. Полученные автором результаты опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах.

Результаты диссертационной работы, а именно методология деликатной (без разрушения) иммобилизации «мягких» объектов – липосом – на твердой поверхности представляют очевидный практический интерес для развития и совершенствования биомедицинских технологий. В дальнейшем на основе полученных результатов могут разрабатываться средства адресной доставки лекарственных веществ, в том числе увеличение терапевтической эффективности уже имеющихся липосомальных лекарств, а также создание мультилипосомальных носителей лекарств. Конструкции на основе рН-чувствительных липосом могут также использоваться в диагностических целях.

Объем диссертации составляет 100 страниц. Работа содержит 1 таблицу, 33 рисунка. Библиография диссертации включает 136 литературных источников. Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследований и логически связаны друг с другом. Диссертация представляет собой законченную работу, обозначенные во введении научная проблема и экспериментальные научные задачи разрешены в результате описанных в работе исследований. Автореферат диссертационной работы и опубликованные автором статьи в достаточной мере отражают содержание диссертации.

В заключение несколько замечаний, которые возникают при знакомстве с работой О.В. Заборовой.

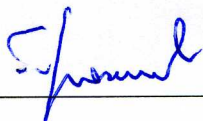
1. В Экспериментальной части следовало бы привести подробную методику синтеза блок-сополимера аргинина и лейцина.
  2. На рисунке 10 дано неверное обозначение горизонтальной оси. Правильная запись:  $[СК+] \times 10^4$ , осново-моль/л.
  3. Стр. 52: В подписи к рисунку 13 не указано содержание анионного липида в липосомах. Между тем эта информация была бы полезна для оценки количества липосом, которые могут связаться с одной поликатионной щеткой.
  4. Стр. 75: Для корректного сравнения цитотоксичности отрицательно заряженного комплекса с цитотоксичностью других образцов его следовало бы готовить таким образом, чтобы избежать присутствия в образце избыточных липосом, не связанных с поликатионными щетками.
  5. Стр. 81: 100 нм частицы, которые регистрируются после (частичного?) гидролиза пептидных связей в молекулах катионного полипептида, значительно превышает размер молекулы трипсина. 100 нм размер и отрицательный заряд могут иметь частицы, сформированные из фрагментов гидролизованных полипептидов (содержащих преимущественно лейциновые последовательности) с адсорбированными на их поверхности молекулами фермента.
  6. В тексте нужно было поместить рисунки, отражающие строение поликатионных щеток и полипептидных везикул.
- Результаты, полученные в диссертации, могут быть использованы в МГУ имени М.В.Ломоносова, в Институте высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург), Российском химико-технологическом университете имени Д.И. Менделеева (Москва), Московском государственном университете тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Институте биохимии имени А.Н. Баха РАН (Москва), Институте биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН (Москва).
- Диссертационная работа О.В. Заборовой «Комплексы катионных полимерных микросфер с отрицательно заряженными липосомами: формирование, строение и свойства» 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 проблемы, имеющей существенное значения для химии высокомолекулярных соединений, а именно:

- использование сферических поликатионных щеток и катионных полипептидных везикул для электростатической иммобилизации анионных липосом;
- получение мультилипосомальных комплексов с наполнителями различной природы;
- описание механизма формирования и функционирования комплексов поликатионных щеток с рН-чувствительными липосомами.

Рецензируемая работа соответствует паспорту специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, области исследования п.5, 8 и 9 (в соответствии с Номенклатурой специальностей научных работников).

Выносимые на защиту результаты исследований О.В. Заборовой были представлены соискателем в ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова» и обсуждены на заседании кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева «31» октября 2014 г. (протокол № 3).

Зав. кафедрой,  
д.х.н, проф.



Прокопов Николай Иванович

9368204@gmail.com

119571, г.Москва, проспект Вернадского, д.86  
ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет  
тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова»