

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИХФ РАН

академик

Берлин А.А.



«13» мая 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности
диссертационной работы

Будкиной Ольги Александровны

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

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

Амфифильные полимеры со свойствами ПАВ – тройные блок- сополимеры этиленоксида (ЭО) и пропиленоксида (ПО), плуроники, благодаря малой токсичности и высокой поверхностной активности находят широкое применение в медицине и фармакологии. В частности, плуроники, в качестве стабилизаторов перфторуглеродных эмульсий входят в состав искусственных заменителей крови, используются в иммунотерапии в качестве адьювантов, т.е. веществ, усиливающих иммунный ответ организма. В 90-х годах было обнаружено усиливающее влияние плуроников на активность противоопухолевых антибиотиков (доксорибуцин, фарморубицин и дауномицин) при одновременном их введении в организм. Однако, несмотря на устойчивый интерес к плуроникам и использование их в клинической и фармакологической практике, наличие отдельных публикаций, посвященных биологической активности плуроников, в частности, их влиянию на множественную лекарственную устойчивость клеток по отношению к противоопухолевым препаратам, сведения о результатах систематических исследований взаимосвязи между структурой сополимеров и вызываемыми ими биологическими эффектами в литературе отсутствуют. В связи с этим диссертационная работа Будкиной О.А., посвященная установлению взаимосвязи между структурой амфифильных блок-сополимеров и их биологической активностью, является несомненно **актуальной.**

В связи с этим диссертационная работа Будкиной О.А., посвященная установлению взаимосвязи между структурой амфифильных блок-сополимеров и их биологической активностью, является несомненно **актуальной**.

Данная диссертация представляет собой систематическое исследование влияния структуры, химической природы и физико-химических свойств широкого круга амфифильных блок-сополимеров и нетоксичных углеводородсодержащих ПАВ на их способность к мицеллообразованию и особенности взаимодействия с раковыми клетками, в частности, о месте локализации этих соединений при их взаимодействии с клетками. **Научная новизна и практическая значимость** диссертации Будкиной О. А. не вызывают сомнений.

Работа изложена на 135 страницах, содержит 42 рисунка, 9 таблиц. Список цитируемых источников состоит из 212 наименований.

Диссертация Будкиной О. А. состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), экспериментальной части (Глава 2), изложения результатов и их обсуждения (Глава 3), заключения, выводов и списка литературы.

Во **введении** автор дает обоснование актуальности проводимых исследований, формулирует их цель и основные задачи.

В **обзоре литературы** подробно описаны структура и свойства исследованных соединений, их взаимодействие с модельными и природными липидными мембранами, влияние на жизнеспособность клеток и их устойчивость к лекарствам, проанализированы предполагаемые механизмы биологического действия изученных соединений. Обзор достаточно полный, написан хорошим языком, и дает представление о современном состоянии науки в области, связанной с темой диссертационной работы.

В **экспериментальной части** содержится перечень объектов исследования и подробно излагаются экспериментальные методы, использованные в работе. На одной и той же линии клеток (клетки аденокарциномы молочной железы человека, обладающие множественной лекарственной устойчивостью) исследовано 16 амфифильных соединений блочного строения.

В первой части **Главы 3** с использованием нескольких подходов определены критические концентрации мицеллообразования практически для всех рассматриваемых соединений и проанализированы основные факторы, влияющие на процесс мицеллообразования. Далее описаны полученные автором результаты систематического исследования влияния мицеллообразования, структуры и химической природы амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ на их взаимодействие с раковыми клетками. В последней части данной главы приведены результаты

исследования локализации ряда рассматриваемых соединений при их взаимодействии с раковыми клетками.

Следует отметить продуманный выбор объектов исследования, которые представляют собой широкий круг амфифильных соединений блочного строения, различающихся по химической природе и топологии блоков. Данный подход позволил изучить влияние отдельных блоков, как гидрофильного, так и гидрофобного, на взаимодействие исследованных соединений с клеточной мембраной и определить, какие особенности структуры (химическая природа и топология блоков) амфифильных полимеров лежат в основе их биологических эффектов. При исследовании цитотоксичности Будкиной О.А. впервые было показано, что водорастворимые амфифильные неионогенные блок-сополимеры только в мицеллярной форме являются токсичными для клеток в культуре. При этом таким свойством обладают сополимеры трехблочного и двублочного строения, гидрофильный блок которых представлен линейным полиэтиленоксидом или разветвленным полиглицерином, а гидрофобный блок образован полипропиленоксидом или полидиметилсилоксаном. Практическая ценность исследования цитотоксичности рассмотренных соединений определяется тем, что была найдена эмпирическая зависимость между гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ) неионогенного амфифильного блок-сополимера и его цитотоксичностью: чем выше значение ГЛБ сополимера, тем он менее токсичен. Систематическое исследование, предпринятое в данной работе, позволило обнаружить, что подобная зависимость справедлива не только для линейных блок-сополимеров, но и для макромолекул, имеющих архитектуру молекулярных щеток (на примере полиглицеринов). Показана возможность использования этой зависимости для прогнозирования области цитотоксических концентраций блок-сополимеров при их практическом применении. На основе полученных результатов в работе был предложен вероятный механизм цитотоксического действия полимеров.

При исследовании цитотоксичности сополимеров автором был обнаружен существенный и неожиданный эффект – в присутствии субтоксичных концентраций большинства рассматриваемых соединений наблюдалось увеличение количества раковых клеток в образцах, что, несомненно, является одним из наиболее важных факторов, которые необходимо учитывать при медицинском применении таких соединений. В попытке найти связь данного биологического эффекта с молекулярным строением полимера, автор пришел к выводу, что увеличение количества раковых клеток в образце в присутствии неионогенных блок-сополимеров определяется молекулярной структурой именно гидрофильного блока и химической природой его звеньев. Так, было показано,

что сополимеры, гидрофильный блок которых - линейный полиэтиленоксид, способствуют увеличению количества раковых клеток, причем с ростом степени его полимеризации уменьшается концентрация полимера, способствующая увеличению количества раковых клеток. Блок-сополимеры, гидрофильный блок которых представлен разветвленным полиглицерином, подобным эффектом не обладали. В работе также обсуждается возможный механизм этого явления, который предполагает взаимодействие ПЭО-содержащих полимеров с олигосахаридными цепочками на поверхности наружной клеточной мембраны (гликокаликсом) за счет образования водородных связей. Это может приводить к формированию слоя из молекул полимера на поверхности клетки, играющего защитную роль. Данная гипотеза, однако, требует дальнейшего исследования и экспериментального подтверждения.

И, наконец, тестирование рассматриваемых соединений на клетках в культуре в присутствии распространенного противоопухолевого антибиотика доксорубина позволило установить характер влияния полимеров на множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) раковых клеток. Следует отметить, что для проведения такого исследования автором была предложена новая постановка эксперимента, заключающаяся в варьировании концентрации именно полимера, а не антибиотика, как это было в общепринятой методике. Такой подход позволил впервые определить для большинства рассмотренных соединений их наименьшие концентрации подавления лекарственной устойчивости раковых клеток. Таким образом, был разработан новый методический прием определения концентрации полимера, оптимальной для подавления МЛУ. Более того, при систематическом исследовании полимеров с применением данного подхода выяснилось, что все проанализированные соединения способны снижать устойчивость раковых клеток к лекарствам, причем эта способность определяется общей гидрофобностью макромолекулы и объемом гидрофобного блока. Чем больше эти величины, тем меньшая концентрация полимера требуется для подавления множественной лекарственной устойчивости раковых клеток. На основе полученных результатов и данных литературы в работе предлагается вероятный механизм действия амфифильных соединений при подавлении МЛУ, который может заключаться в дестабилизации липидного микроокружения белка Р-гликопротеина, ответственного за МЛУ, при встраивании гидрофобного блока амфифильного соединения в наружную мембрану раковых клеток. Возмущение мембраны вокруг этого белка приводит к угнетению его работы по выбросу лекарства из клетки. Однако это предположение также требует экспериментального подтверждения.

В заключительной части Главы 3 автором проведено исследование локализации рассматриваемых соединений при их взаимодействии с клетками, направленное на прояснение механизма биологического действия полимеров на раковые клетки. Методом радиоавтографии было показано, что все исследованные тритий-меченые соединения локализуются на поверхности раковых клеток. Необходимо отметить, что данные результаты были получены в тех же условиях эксперимента, при которых анализируемые соединения вызывали наблюдаемые биологические эффекты. В связи с этим автор приходит к выводу, что способность блок-сополимеров оказывать разное влияние на клетки согласуется с возможностью взаимодействия гидрофильных и гидрофобных блоков с разными областями наружной клеточной мембраны – гликокаликсом и липидным бислоем, соответственно. Однако, судя по полученным результатам, полностью исключить возможность проникновения полимеров внутрь клеток нельзя.

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, посвященные физико-химическим и биологическим свойствам амфифильных соединений блочного строения *in vitro*.

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

Принимая во внимание, что исследования О.В.Будкиной в данной работе носят фундаментальный характер и проводились с целью выяснения того, какие особенности молекулярной структуры амфифильных соединений блочного строения определяют их биологическую активность при взаимодействии с раковыми клетками, можно сделать следующие замечания:

- 1) В диссертации методом гель-проникающей хроматографии проанализировано молекулярно-массовое распределение плуроников L61, L64, F127, P123, REP и ЭО₅₄-ДМС₇ (стр. 43). Однако результаты анализа (хроматограммы, моменты распределения) не приведены. Возникают вопросы, с какой целью исследовали ММР коммерческих образцов плуроников, имеющих гарантированную молекулярную массу и почему этим методом не были проанализированы все исследуемые в работе соединения.
- 2) Для изучения локализации сополимеров в клетках диссертантом использован метод радиоавтографии. Однако, поскольку однозначного ответа на вопрос о

локализации амфифильных соединений при их взаимодействии с клетками не получено, желательно было бы использовать альтернативные методы исследования локализации соединений в клетках.

Результаты, полученные в диссертации Будкиной О. А. могут быть использованы при проведении научных исследований в области химии высокомолекулярных соединений и биохимии в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии наук» (ИХФ РАН, Москва), Московском государственном университете тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук (Москва), Институте высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург), Институте синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН (ИСПМ РАН, Москва).

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.

Работа Будкиной О. А. по своей актуальности, научной и практической значимости удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, и соответствует п. 9 паспорта специальности 02.00.06 – «Высокомолекулярные соединения» (химические науки) и п. 14 паспорта специальности 03.01.04 – «Биохимия» (химические науки) в соответствии с Номенклатурой специальностей научных работников, и ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук.

Выносимые на защиту результаты исследований Будкиной О. А. были представлены соискателем в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт химической физики им. Н.Н.Семенова Российской Академии наук» (ИХФ РАН) «12» мая 2015 г. (протокол № 11).

Зав.лабораторией 1637

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

«Институт химической физики

им. Н.Н. Семенова Российской Академии наук»

(ИХФ РАН)



Соловьева Анна Борисовна

доктор химических наук, профессор

119991, Россия, Москва, ул. Косыгина, 4

Тел.: 8495-939-7395

e-mail: anna@polymer.chph.ras.ru

Ученый секретарь

Института химической физики

им. Н. Н. Семенова РАН, к.х.н.



Стрекова Л. Н.

Подпись Соловьевой А. Б. Заверяю

