

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Шершаковой Н.Н.
«Фуллерен С60: механизм биологической активности и разработка подходов к
терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом» на соискание ученой
степени доктора биологических наук
по специальности «3.2.7. Иммунология»

Актуальность темы

Фуллерен С60 обладает ярко выраженной биологической активностью, однако лекарственные препараты на его основе пока отсутствуют. Данный факт объясняется отсутствием единого мнения относительно безопасности, фармакокинетики, депонирования молекул фуллерена С60, а также неизученностью механизмов биологической активности. Кроме того, фуллерен С60 нерастворим в воде и для разработки и внедрения потенциальных терапевтических средств на его основе необходима масштабируемая технология получения его водного раствора.

Актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений, поскольку автор не только выявил определенную биологическую активность водного раствора немодифицированного фуллерена С60 (ВРФ), но и ответил на вопросы безопасности и перспективности его использования в медицине. Кроме того, автором была масштабирована технология наработки ВРФ, получаемого по уникальной методике без применения токсичных органических веществ. Изучение биологической активности ВРФ на экспериментальных моделях атопического дерматита, анафилактического шока, пищевой аллергии показало его способность подавлять аллергическое воспаление. В диссертации была также изучена противовирусная, фолликулостимулирующая и ранозаживляющая активность ВРФ в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Автором исследована токсичность ВРФ, его биораспределение по органам и экскреция из организма. Проведена масштабная работа по изучению механизмов действия фуллерена, проработаны несколько гипотез, проанализирована антиоксидантная активность ВРФ, изучена способность фуллерена взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором (АУР) и с мембранными фосфолипидами.

Данные, представленные в диссертационной работе, представляют большой интерес для фундаментальных исследований в плане, а также позволяют ответить на ряд вопросов о возможности клинического применения ВРФ.

Соответствие темы диссертации научной специальности

В диссертационной работе были проведены исследования фармакокинетики фуллерена, оценка токсических эффектов, анализ возможного механизма действия молекулы С60, а также изучены биологические эффекты ВРФ, что обуславливает перспективность разработки на его основе новых лекарственных средств для терапии воспалительных заболеваний. Тема исследований соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология»: п. 2 - Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии; п. 3 - Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты; п. 6 - Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов.

Основные результаты диссертационной работы

Впервые показано, что немодифицированный фуллерен С60, полученный по уникальной биосовместимой масштабируемой технологии в высокой концентрации, обладает биологической активностью, а именно: проявляет противовоспалительную, регенеративную, противовирусную, а также активность в отношении стимуляции процесса роста волос. В частности, установлено влияние водного раствора фуллерена С60 при накожном нанесении и подкожном введении на иммунный ответ у лабораторных животных с экспериментальным атопическим дерматитом (АтД). При накожных аппликациях С60 наблюдалось снижение уровня специфических IgE, IL-4 и IL-5, а также повышение уровня IL-12 и IFN γ , что говорит, о сдвиге иммунного ответа в сторону Th1-типа. Важным результатом исследования стало обнаружение повышения уровня экспрессии гена структурного белка эпидермиса филаггрина при накожном нанесении водного раствора фуллерена. Филаггрин, способствует восстановлению эпидермального барьера кожи. Указанные данные подтверждены гистологическим исследованием кожи мышей.

На модели экспериментальной пищевой аллергии (ПА) анализ клинических, иммунологических и гистологических критериев показал, что пероральное введение ВРФ подавляет Th2-иммунный ответ, выработку специфического IgE, снижая эозинофилию в тощей кишке тонкого отдела кишечника и уменьшая степень проявления аллергической диареи.

При моделировании у лабораторных животных состояния анафилактического шока (АШ), группы, получавшие фуллерен С60 показали наименьший процент гибели

мышей, а уровень специфического IgE и цитокинов Th2-типа иммунного ответа был снижен по сравнению с контрольными группами.

На модели раневого поражения было установлено наличие у фуллерена С60 способности стимулировать заживление ран. Интенсивный процесс заживления отмечался при нанесении ВРФ на участок кожи после иссечения или моделирования химического ожога. Данные визуальной оценки были подтверждены гистологическим анализом. Детальный анализ экспрессии генов, вовлеченных в процесс регенерации кожи, показал повышение уровня экспрессии *Hmgb1*, *Vegfa*. кроме того, было продемонстрировано подавление уровня экспрессии генов *Tnfa*, *Il1a*, *Il1b* и *Il6*.

В диссертационной работе водный раствор фуллерена был использован в качестве инновационного компонента для терапии заболеваний, связанных с герпес-вирусной инфекцией. Эксперименты показали наличие у фуллерена способности подавлять инфекционную активность герпес-вируса *in vitro*, а также противовирусных свойств при эпидермальном нанесении ВРФ в отношении кожной ВПГ1-инфекции у мышей.

В диссертационном исследовании автор рассматривает ВРФ как интересную альтернативу современным подходам к лечению алопеции и исследует активность фуллерена в отношении стимуляции процесса роста волос, и его воздействие на волосяные фолликулы. По совокупности полученных данных *in vivo* исследований на мышах линии nu/nu, в работе сделан вывод о способности фуллерена С60 стимулировать рост волос. Применение фуллерена С60 увеличивало экспрессию генов, кодирующих фактор WNT10b, который участвует в процессах формирования и развития волосяного фолликула. Кроме того, было показано, что в присутствии ВРФ увеличивалась экспрессия факторов ангиогенеза. У животных, получавших ВРФ, было зафиксировано снижение экспрессии гена фактора TNFa, который негативно влияет на рост волос. Анализ гистологических срезов кожи животных, получавших фуллерен С60, показал достоверное увеличение количества волосяных фолликулов.

Большая часть масштабной работы автора посвящена определению возможных клеточных мишеней взаимодействия фуллерена для обоснования механизма его биологической активности. Автором была выдвинута гипотеза о том, что одной из клеточных мишеней фуллерена С60 в организме могут являться макрофаги, что обуславливает противовоспалительный и ранозаживляющий эффекты данного соединения. Было показано, что фуллерен С60 способен влиять на хемотаксис макрофагов, стимулируя экспрессию гена *Ccl2*. Кроме того, в присутствии фуллерена С60 было выявлено изменение уровня экспрессии генов макрофагов в процессе их дифференцировки до фенотипа M1 или M2. Также было выдвинуто предположение о

взаимодействии ВРФ с арил-углеводородным рецептором, с которым тоже может быть связана биологическая активность фуллерена. При проведении исследований для обоснования данной гипотезы была показана способность фуллерена С60 ингибировать экспрессию генов, кодирующих АУР и цитохромы CYP1A1 и CYP1B1 наряду со стимуляцией экспрессии генов факторов антиоксидантной защиты. Полученные автором данные позволяют существенно приблизиться к пониманию механизма действия фуллерена С60.

Установлена безопасность ВРФ. ВРФ не обладает токсическим эффектом независимо от пути его введения. Данные гистологического анализа тканей и внутренних органов животных свидетельствуют об отсутствие токсического действия фуллерена С60. Изучение фармакокинетики водного раствора фуллерена С60 и его выведение из организма показало, что фуллерен может активно выводиться из организма как через почки, попадая в мочу, так и через желчные протоки, попадая затем в фекалии. Через 72 часа фуллерен С60 в организме не обнаруживался.

Таким образом, полученные данные обосновывают возможность проведения ДКИ и КИ для дальнейшего использования водного раствора фуллерена и препаратов на его основе в клинической практике.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных автором результатов, изложенных в диссертационной работе «Фуллерен С60: механизм биологической активности и разработка подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом» не вызывает сомнений. В диссертационном исследовании автор использовала широкий комплекс современных методов исследования, в том числе методы выделения, культивирования и стимуляции клеток, а также ИФА, ОТ-ПЦР в реальном времени, проточную цитометрию, различные методы поляризации макрофагов, методы анализа фармакокинетических параметров. В работе представлен целый спектр методов моделирования различных патологий *in vivo*, а том числе экспериментального атопического дерматита, экспериментальной пищевой аллергии, состояния анафилактического шока, алопеции, герпес-вирусной инфекции, экспериментальных раневого и ожогового воспалений. Все результаты были получены с использованием специализированного сертифицированного оборудования.

Полученные автором экспериментальные данные с достаточным числом наблюдений обработаны с применением современных статистических методов и являются достоверными и воспроизводимыми.

Научная новизна диссертационной работы

Настоящая диссертационная работа обладает несомненной новизной. На экспериментальных моделях различных патологий впервые показано биологическое действие немодифицированного фуллерена С60, полученного в высокой концентрации по уникальной биосовместимой масштабируемой технологии.

Впервые был проведен анализ фармакокинетических показателей и распределения немодифицированного фуллерена С60 по внутренним органам. Продемонстрировано, что соединение способно преодолевать гематоэнцефалический барьер. Впервые показано, что фуллерен С60 выводится из организма через почки и желчные протоки. Впервые осуществлена оценка острой и хронической токсичности ВРФ, полученного по уникальной технологии, которая не выявила токсического или раздражающего действия фуллерена С60, и подтвердила его безопасность.

Впервые показана перспективность применения немодифицированного фуллерена С60, полученного по новой биосовместимой масштабируемой методике, в качестве противовирусного средства. На модели герпес-вирусной инфекции (ВПГ1) *in vivo* было показано, что ВРФ предотвращает ВПГ1 инфекцию культуры клеток и проявляет терапевтические противовирусные свойства.

Впервые проведено исследование и обосновано предположение о способности фуллерена С60 взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором.

Впервые продемонстрирована способность фуллерена С60 влиять на уровень экспрессии макрофагами генов провоспалительных цитокинов, а также ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость диссертационной работы заключается, прежде всего, в получении новых знаний о структуре частиц водной дисперсии фуллерена, а также способности фуллерена С60 влиять на экспрессию генов различных сигнальных путей, в том числе участвующих в процессах воспаления, ангиогенеза, аллергии и роста волос, которые расширяют понимание возможных механизмов биологической активности фуллерена. Так, важным теоретическим значением является выявление способности ВРФ участвовать в восстановлении барьерной функции кожи. На это указывает экспериментально показанная стимуляция под действием ВРФ экспрессии гена филагрина при моделировании атопического дерматита, который, как известно, является патогенетически значимым геном и делеция в данном гене обуславливает

предрасположенность к развитию указанной аллергопатологии. Следует отметить, что у ряда пациентов с таким диагнозом действительно нарушен синтез филагрина и других белков, выполняющих барьерную функцию.

Весьма интересным и ценным в теоретическом плане является способность ВРФ ингибировать экспрессию гена *Tnfa*, как показано *in vivo* на моделях атопического дерматита, раневого и ожогового воспалений, а также на модели алопеции. Важно также, что ингибирование данного гена было показано в присутствии ВРФ *in vitro* на макрофагах. На модели алопеции была также показана активация аденоzinового рецептора, который, как известно, способен ингибировать выработку TNFa. Полученные данные наряду с данными об ингибировании экспрессии генов ряда других провоспалительных факторов свидетельствуют о противовоспалительной активности ВРФ, а также являются важным этапом исследований, направленных на раскрытие механизмов биологической активности фуллерена. Полученные новые знания о влиянии ВРФ на гены различных сигнальных путей позволяют исследователям проводить дальнейшие работы в данном направлении, что позволит всецело понять и изучить механизмы биологической активности ВРФ.

Важное теоретическое значение имеют обширные данные, полученные в процессе разработки гипотезы о том, что противовоспалительный, ранозаживляющий и противоаллергический эффект ВРФ опосредован взаимодействием молекулы фуллерена с макрофагами. В визуальном эксперименте, где очевидно происходило перераспределение клеток в пользу области с фуллереном, было показано, что фуллерен способен привлекать к себе макрофаги. Полученные данные были затем подтверждены путем анализа экспрессии гена важнейшего фактора хемотаксиса макрофагов CCL2, которая увеличивалась под действием ВРФ. В следующей серии экспериментов разрабатывалась гипотеза о способности ВРФ взаимодействовать с фосфолипидами мембранных клеток. Показано, что противовоспалительный эффект ВРФ, который был продемонстрирован как *in vivo*, так и *in vitro* значительно снижался при добавлении в ВРФ свободного лецитина. По-видимому, лецитин связывался с молекулами фуллерена, ингибируя взаимодействие его с клетками. На модели макрофагов в присутствии ВРФ с лецитином было продемонстрировано ярко выраженное снижение эффекта подавления экспрессии генов *TNFA*, *IL1B*, *IL6*, *NFKB*, *COX1*, *COX2*, *ALOX5*, *ALOX12*. Представленные данные имеют важное теоретическое значение, поскольку они свидетельствуют о том, что взаимодействие ВРФ с мембранными фосфолипидами может не только блокировать процесс перекисного окисления липидов, но и экранировать фосфолипиды от воздействия фосфолипаз,

обуславливая противовоспалительную активность молекулы фуллерена и раскрывая механизм данной активности.

Несомненную теоретическую значимость диссертационного исследования имеет обоснование гипотезы о взаимодействии молекул фуллерена С60 с АУР. На основании результатов молекулярного докинга была установлена теоретическая возможность связывания ВРФ с этим рецептором, а *in vitro* эксперименты показали изменение под действием ВРФ уровня экспрессии генов, связанных с АУР.

Полученный автором массив новых данных может стать основой для проведения дальнейших фундаментальных исследований по изучению механизма действия фуллерена С60, его производных, а также других углеродных наночастиц.

Научно-практическая значимость работы

Данные об отсутствии острой и хронической токсичности водного раствора фуллерена свидетельствуют о безопасности полученной водной формы немодифицированного фуллерена, что обуславливает научно-практическую значимость работы и является важным аспектом для возможности проведения доклинических испытаний препаратов на основе ВРФ и его дальнейшего использования его в медицинских целях. Автором изложены экспериментальные доказательства экскреции немодифицированного фуллерена С60, а именно исследованы фармакокинетические параметры. По результатам исследований выведения и распределения фуллерена в организме можно сделать заключение о том, что молекула фуллерена не депонируется, способна проникать во все органы, включая мозг, а также способна выводиться преимущественно в неизменном виде через ЖКТ и почки.

Научно-практическое значение диссертационного исследования заключается также в показанной способности ВРФ, полученного по уникальной технологии, проявлять биологическую активность. Получены новые обширные сведения о влиянии водного раствора фуллерена на иммунный ответ при различных аллергических патологиях, таких как атопический дерматит, анафилактический шок, пищевая аллергия, а также ряд данных о противовирусной, фолликулостимулирующей и ранозаживляющей активности фуллерена. Данные о противоаллергической активности ВРФ свидетельствуют о перспективности использования ВРФ в качестве действующего вещества для создания новых препаратов для терапии аллергических заболеваний. Применение ВРФ при терапии экспериментальной модели раневого поражения показало увеличение экспрессии генов, кодирующих факторы ангиогенеза, а также подавление экспрессии провоспалительных генов. Представленная

противовоспалительная и ранозаживляющая активности ВРФ делают его новым перспективным средством для терапии раневых и ожоговых воспалений. Противовирусная активность ВРФ говорит о возможности рассматривать фуллерен в качестве кандидатного препарата для подавления герпес-вирусных инфекций. Следует отметить, что противовирусные препараты на основе ВРФ могут быть весьма эффективны для пациентов с устойчивостью к имеющимся терапевтическим средствам на основе ацикловира, поскольку механизм действия ВРФ предполагает связывание с белками вириуса и блокированием его взаимодействия с клеткой. Выявленная фолликулостимулирующая активность фуллерена C60 создает предпосылки к использованию ВРФ при разработке новых эффективных средств для лечения алопеции. Изучение фолликулостимулирующей активности ВРФ показало увеличение экспрессии важнейших Wnt-ассоциированных генов, участвующих в развитии волоссяных фолликулов, факторов ангиогенеза, а также снижение экспрессии гена, кодирующего TNFa, которому автор отдает ведущую роль при описании механизма данной активности фуллерена. Чрезвычайно важное научно-практическое значение имеет тот факт, что при прекращении введения ВРФ эффект не исчезает, а качество растущего волоса соответствует здоровому волосу. Кроме того, важное значение имеет также продемонстрированная на мышах линии nu/nu способность ВРФ достоверно увеличивать количество фолликулов на единицу площади.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно сделать вывод о перспективности использования ВРФ в качестве основы для разработки эффективных и безопасных лекарственных препаратов для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Очевидной практической ценностью работы также является тот факт, что в настоящее время в России зарегистрированы два косметических средства на основе ВРФ – восстанавливающий крем, который показал противовоспалительную, ранозаживляющую, а также противовирусную активность, и спрей для роста волос, который также показывает себя как эффективное средство, останавливающее выпадение волос и стимулирующее их рост.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация имеет традиционную структуру и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы, который включает 396 источников, из них 334 зарубежных и 62 отечественных. Диссертация изложена на 432 страницах, содержит 42 таблицы и 172 рисунка.

В обзоре литературы широко представлена информация о биологическом действии фуллерена и описано его потенциальное применение в терапии аллергических и других заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Обзор литературы достаточен по объему и обосновывает необходимость проведения настоящего исследования. В главе «Материалы и методы» описаны использованные в ходе диссертационной работы современные методы исследования. Работа выполнена на высоком методологическом уровне. В главе «Результаты» автор приводит данные биологического действия фуллерена С60, полученные в результате исследований, проведенных на экспериментальных моделях *in vivo* на мышах, исследования *in vitro* на культурах клеток, а также по итогам анализа фармакокинетических параметров. Описание результатов представлено логично и грамотно. В главе «Обсуждение» анализируются результаты проведенных масштабных исследований. Рассматривается характер влияния ВРФ на иммунный ответ в экспериментальных моделях аллергии, ранозаживления, алопеции, герпетической инфекции. Выводы четко сформулированы и обоснованы результатами исследований. Диссертация хорошо иллюстрирована.

Основные результаты диссертации опубликованы в 45 научных работах, в том числе 24 статьи опубликованы в российских и зарубежных научных журналах, 5 патентов и 16 публикаций в сборниках трудов отечественных и международных конференций и конгрессов.

Принципиальных замечаний по выполненной диссертационной работе нет.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Заключение

Диссертация Шершаковой Н.Н. «Фуллерен С60: механизм биологической активности и разработка подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области иммунологии: установлено, что водный раствор фуллерена С60 не токсичен и не имеет кумулятивного эффекта, способен проникать во все органы и выводиться через почки и ЖКТ в течение 72 часов; продемонстрировано, что ВРФ, полученный по уникальной масштабируемой технологии, обладает противоаллергическим действием, проявляет регенеративную активность, способен блокировать развитие герпес-вирусной инфекции, стимулировать рост волос; впервые

показано, что молекула фуллерена С60 способна взаимодействовать с АУР; впервые выявлено влияние ВРФ на экспрессию АУР-ассоциированных генов, факторов антиоксидантной защиты; впервые получены данные о влиянии ВРФ на макрофаги, в том числе на хемотаксис данных клеток и экспрессию гена *Ccl2*; обосновано, что мишенью фуллерена С60 при взаимодействии с макрофагами являются фосфолипиды мембранны; показана возможность потенциального использования ВРФ в качестве основы для разработки инновационных лекарственных средств с противовоспалительной и ранозаживляющей активностью; показана перспектива создания на основе ВРФ противовирусных лекарственных средств, а также препаратов для терапии алопеции.

Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 в ред. от 26 октября 2023 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности «3.2.7 — Иммунология».

Официальный оппонент, ведущий научный сотрудник
лаборатории клинической иммунологии и инновационных
технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н.Блохина»
Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор

З.Г.Кадагидзе

Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д.24
ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н.Блохина» Минздрава России
Телефон: Тел. 8 903 149 29 74.

Подпись З.Г.Кадагидзе заверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ онкологии
имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, к.м.н.

«__12__» __февраля__ 2024 г



И.Ю. Кубасова