

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Калюжина Олега Витальевича на диссертационную работу Шершаковой Надежды Николаевны «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 диссертационного исследования

Одной из задач современной иммунологии является поиск и разработка новых высокоэффективных иммуномодулирующих препаратов, оптимизация схем их применения, а также фундаментальное изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний для создания инновационных методов их диагностики и терапии.

Фуллерен С60 – это аллотропная модификация углерода, уникальные свойства которой активно используются современными исследователями в различных областях, в том числе в биологии, медицине, фармации и косметологии. Фуллерен был открыт и охарактеризован в 1985 году Г. Крото, Р. Керлом и Р. Смолли, за свою работу авторы в 1996 году были удостоены Нобелевской премии по химии. В настоящее время получение не токсичной водорастворимой формы фуллерена является актуальной задачей для исследователей, поскольку он обладает целым рядом биологических активностей, включая противовоспалительную, противовирусную и антиоксидантную.

Данная диссертационная работа включает описание нового способа получения высококонцентрированного водного раствора фуллерена С60 (ВРФ), пригодного для медицинского применения. Автором описана и экспериментально подтверждена безопасность и биологическая активность ВРФ, показана перспектива его использования в качестве средства для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Тема диссертации соответствует научной специальности 3.2.7. Иммунология, а именно пунктам паспорта научной специальности: (2) изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии; (3) изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты; (6) разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов.

Основные результаты диссертационной работы

Исследуемым в работе соединением являлся водный раствор фуллерена С60. В работе осуществлена оптимизация и масштабирование технологии получения ВРФ, что позволило провести исследование биологических эффектов данного соединения.

В результате проведенной работы была изучена биологическая активность водного раствора фуллерена С60, полученного по уникальной технологии, на различных экспериментальных моделях *in vivo*. На модели экспериментального атопического дерматита было установлено, что ВРФ значительно снижал кожное воспаление. Было показано улучшение гистологической картины аллергического воспаления, а также снижение продукции цитокинов Th2-типа иммунного ответа наряду с увеличением продукции цитокинов Th1-типа. Важный результат, полученный при моделировании данной патологии – выявление способности ВРФ стимулировать экспрессию гена белка филаггрина, который является важнейшим компонентом кожного покрова и выполняет барьерную функцию. Значимость данного факта высока, поскольку нарушение синтеза белков кожного барьера играет очень важную роль в патогенезе атопического дерматита. Например, известно, что 25% пациентов с атопическим дерматитом имеют мутацию именно в гене белка филаггрина, следствием чего является неполноценность кожного барьера, что способствует проникновению аллергенов и сенсибилизации организма.

Ярко выраженная противоаллергическая активность ВРФ была также продемонстрирована на моделях экспериментальной пищевой аллергии и анафилактического шока. Экспериментально показано, что выживаемость мышей, получавших ВРФ, при моделировании состояния шока составляла 60% по сравнению с животными без терапии. При моделировании же пищевой аллергии было показано, что у мышей, получавших ВРФ, был снижен уровень специфических IgE и цитокинов Th2-типа иммунного ответа. При гистологическом анализе тощей кишки тонкого отдела кишечника было выявлено снижение степени эозинофилии. Что касается клинических признаков, проявляющихся при моделировании данной патологии у животных, то при проведении терапии ВРФ было показано существенное уменьшение степени выраженности аллергической диареи.

Важным аспектом работы было изучение противовоспалительной и ранозаживляющей активности ВРФ, которые исследовались на моделях экспериментального раневого и ожогового воспалений. Была продемонстрирована регенерирующая активность ВРФ сравнимая или даже, в некоторой степени, превосходящая известные терапевтические средства. Патоморфологический анализ гистологических срезов кожи при моделировании ожогового воспаления с последующим

проводением терапии ВРФ показал, что его нанесение улучшает гистологическую картину пораженного участка кожи. Также была показана способность ВРФ влиять на уровень экспрессии генов факторов, вовлеченных в процессы ангиогенеза и воспаления кожного покрова у мышей. По этим данным можно заключить, что ВРФ способен стимулировать регенеративные процессы в коже и купировать воспаление. На модели алопеции с использованием, в том числе иммунодефицитных мышей, был показан эффект стимуляции роста волос при введении ВРФ. Оценка результата проводилась путем визуального анализа поверхности кожи мышей *nu/nu*, а также путем анализа экспрессии патогенетически значимых генов, а также генов, необходимых для формирования системы питания развивающихся фолликулов. Было продемонстрировано увеличение экспрессии генов *Wnt10b*, *Dkk1*, *Srd5a2*, *Vegfa*, *Egf* и *Fgfb*, а также подавление экспрессии гена *Tnfa*, что может происходить путем активации аденоzinового рецептора A2AAR. Важным и очень интересным результатом, показанным в данной работе на экспериментальной модели алопеции, является практически полное отсутствие «эффекта отмены терапии» ВРФ, что является крайне важным и дает определенные конкурентные преимущества перед имеющимися лекарственными средствами для терапии указанной патологии.

В работе также была проведена оценка способности ВРФ проявлять противовирусную активность на модели герпес-вирусной инфекции *in vivo* и *in vitro*. Было показано, что ВРФ способен предотвращать инфицирование культуры клеток вирусом простого герпеса типа 1, а также обладает способностью нейтрализовать инфекционную активность вируса. Проведение терапии экспериментальной вирусной инфекции ВРФ показало терапевтическую эффективность препарата в отношении кожной герпес-вирусной инфекции у мышей.

Важным результатом, описанным в диссертационной работе, является демонстрация отсутствия токсических эффектов ВРФ, что говорит о безопасности данного препарата и перспективности его использования для создания на его основе лекарственных средств. В работе освещен также вопрос распределения и выведения фуллерена из организма. Исследование фармакокинетики фуллерена С60 проводилось при накожном нанесении ВРФ, интрагастральном и внутривенном введениях. По итогам исследования можно сделать вывод, что фуллерен С60 способен активно выводиться из организма через почки и через желчные протоки. Наличие его в моче и кале фиксировалось в течение 72 часов. По истечении этого времени даже следовых количеств фуллерена С60 не обнаруживалось. Степень выведения фуллерена С60 в неизмененном виде составляла, по крайней мере, около 70%.

Внушительная часть диссертационной работы посвящена изучению механизмов биологической активности ВРФ. Автором было выдвинуто сразу несколько рабочих гипотез. Согласно одной из них, молекула фуллерена C60 рассматривается в качестве лиганда арил-углеводородного рецептора (АУР). При разработке данной гипотезы было показано, что теоретически молекула фуллерена C60 может связываться с АУР как во внутренней полости PAS-В домена АУР, так и в канале Е2. ВРФ способен влиять на экспрессию генов, ассоциированных с АУР, в том числе *Nrf2*, *Nqo1*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*. На основе полученных данных, автор делает вывод о том, что АУР может являться мишенью молекулы фуллерена C60 при взаимодействии с клеткой, обуславливая показанные ранее эффекты ВРФ, а именно: противовоспалительный и противовирусный.

Автор не оставляет без внимания общепринятое мнение о том, что эффекты фуллерена C60 связаны с его антиоксидантной активностью. В работе представлено два способа определения антиоксидантной активности фуллерена C60 – в NBT-тесте и с использованием флуоресцентного зонда белковой природы NuPer, который позволяет регистрировать динамику изменения внутриклеточной концентрации H₂O₂. По результатам исследований было показано подавление окислительного процесса под действием ВРФ (в среднем на 30%). Следующая собственная гипотеза автора о механизме действия фуллерена C60 описывает проявление ранозаживляющей активности ВРФ, который способен усиливать хемотаксис макрофагов и привлечение данных клеток в зону поражения. Известно, что скорость прибытия макрофагов в рану является ключевым фактором, который обуславливает не только ускорение процесса регенерации, но и минимизирует вероятность образования рубца. Полученные при разработке данной гипотезы результаты показали, что ВРФ способен влиять на распределение макрофагов, что было наглядно показано в тесте *in vitro*. ВРФ усиливал экспрессию гена фактора хемотаксиса моноцитов/макрофагов CCL2 в 1,8 раза, что автор логично счел за подтверждение гипотезы об ускорении прибытия макрофагов в зону присутствия ВРФ.

Автором была представлена еще одна собственная гипотеза о механизме действия фуллерена C60, где он высказывает предположение о том, что противовоспалительный эффект фуллерена C60 объясняется связыванием этой гидрофобной частицы с фосфолипидами мембранны клеток, в том числе макрофагов. Для разработки и обоснования данной гипотезы автором была проведена довольно масштабная серия экспериментов по изучению изменения экспрессии генов провоспалительных/противовоспалительных факторов дифференцированными макрофагами в присутствии/отсутствии ВРФ и лецитина, который использовался в качестве фосфолипида, способного конкурировать с мембранными. Автором были

представлены весьма убедительные данные в отношении противовоспалительного эффекта ВРФ, который он проявлял, ингибируя экспрессию генов ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов (COX-1, COX-2, ALOX-5, ALOX-12), а также провоспалительных факторов и цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B), и который значительно снижался при внесении лецитина. Это ослабление противовоспалительной активности ВРФ автор связывает с присутствием свободного лецитина, который, вероятно, связывал молекулы фуллерена С60. На основе результатов, полученных при разработке гипотез о механизме биологической активности ВРФ, автором была представлена наглядная схема. На схеме отражен механизм противовоспалительной, ранозаживляющей и противоаллергической активности ВРФ. Интересным выглядит предположение о возможном механизме стимуляции роста волос в присутствии ВРФ. Ключевым фактором, по мнению автора, здесь является TNF α , который крайне негативно влияет на рост и развитие волосяного фолликула. Экспрессия данного гена снижается в присутствии ВРФ, что коррелирует также с усилением экспрессии гена аденоzinового рецептора, активация которого подавляет выработку TNF α .

Таким образом, очевидно, что поставленные автором цели и задачи исследования достигнуты. Диссертационная работа представляет собой масштабный труд, где автор не только показывает на различных моделях *in vivo* ряд биологических эффектов ВРФ, но и, что всегда особенно ценно для научной работы, предпринимает попытку выявить и обосновать возможные механизмы показанной активности.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа «Фуллерен С60: механизм биологической активности и разработка подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом» выполнена на современном научном уровне. Для проведения исследования использовались стандартизованные методики. Работа выполнялась на специализированном оборудовании, которое имеет сертификаты и проходит регулярную поверку. Дизайн проведенных исследований грамотно описан и реализован. Статистическая обработка данных корректна, использованы современные методы статистики. Все это позволяет высоко оценить степень достоверности представленных в диссертации данных.

Научная новизна диссертационной работы

Новизна представленных в диссертационной работе данных не вызывает сомнений.

В работе представлена модификация с целью масштабирования не имеющей аналогов в мире технологии получения ВРФ, которая представляет собой уникальную методику перевода нерастворимого фуллерена С60 в водную фазу без использования

привычных для мировой практики токсичных органических соединений, УЗ и нагревания. Использование технологии ультрафильтрации позволяет получать большие объемы высококонцентрированного ВРФ.

В данной работе впервые показаны и столь широко описаны различные эффекты ВРФ, полученного по инновационной технологии. На восьми различных экспериментальных моделях *in vivo* представлены результаты относительно противовоспалительной, ранозаживляющей, противоаллергической, противовирусной активности ВРФ, а также его способности стимулировать рост волос.

Уникальность и особенная научная ценность представленной диссертационной работы заключается в обобщении имеющихся и описании собственных гипотез о механизме действия фуллерена С60, чего ранее не было представлено и описано в мировой литературе. Структурированные и обобщенные данные приближают к пониманию механизма столь разнообразных эффектов фуллерена С60 и могут служить основой для дальнейших фундаментальных исследований в данной области знаний.

Важным аспектом работы является то, что впервые было показано отсутствие токсических эффектов немодифицированного фуллерена С60, полученного по уникальной биосовместимой технологии, *in vivo*. Кроме того, впервые проведено изучение фармакокинетики фуллерена С60 и его распределения по внутренним органам, что является весьма важным вопросом при разработке лекарственных средств.

В представленной диссертационной работе впервые показана перспективность использования ВРФ для создания на его основе лекарственных средств, обладающих противовоспалительной, ранозаживляющей и противовирусной активностью. Кроме того, представлены очевидные предпосылки для разработки на основе ВРФ средств для терапии алопеции.

Теоретическая значимость работы

Теоретической ценностью диссертационной работы является установление механизма биологической активности ВРФ, определение локализации биологических мишеней фуллерена, а также анализ распределения фуллерена С60 в организме.

Механизм биологической активности фуллерена С60 изучен автором в целом ряде исследований. Изучена и обоснована гипотеза о возможности взаимодействия молекул фуллерена С60 с АУР. Метод молекулярного докинга позволил построить модели связывания АУР с фуллереном С60, на которой было показано, что этот лиганд способен связываться с внутренней полостью PAS-В и проходить в канал Е2. Автором была показана способность фуллерена С60 влиять на экспрессию АУР и ассоциированных с АУР генов (*Cyp1a1*, *Cyp1b1* и генов факторов антиоксидантной защиты).

Теоретическую значимость также имеет предложенная в диссертационной работе гипотеза о способности молекул фуллерена С60 взаимодействовать с макрофагами и влиять на уровень экспрессии ими генов. Экспериментально было установлено, фуллерен С60 способен ускорять миграцию макрофагов и увеличивать экспрессию гена *Ccl2*, а также влиять на экспрессию провоспалительных и противовоспалительных генов макрофагов. Кроме того, было показано, что в присутствии ВРФ наблюдается торможение процесса дифференцировки макрофагов. При предварительной инкубации с ВРФ клеток М1, наблюдается уменьшение количества клеток, экспрессирующих маркер CCR7 и увеличение количества клеток, экспрессирующих маркер CD206, а при инкубации с ВРФ клеток М2 напротив – уменьшение количества CD206+ клеток и уменьшение CCR7+ клеток. Представленные данные указывают на способность ВРФ проявлять модулирующую активность в отношении макрофагов, способствуя развитию соответствующего типа иммунного ответа, что может обуславливать противовоспалительный и противоаллергический эффекты.

Теоретическую ценность представляет выдвинутое в диссертационной работе предположение о способности фуллерена С60 взаимодействовать с фосфолипидами мембранных клеток. Доказательство данного взаимодействия приближает к пониманию механизма противовоспалительной и противоожоговой активности ВРФ, показанной в работе. *In vitro* на макрофагах было продемонстрировано, что в присутствии ВРФ уровень экспрессии генов *TNFA*, *IL6*, *IL1B* и *NFKB* снижался, а при введении свободного лецитина в качестве конкурирующего с мембранными фосфолипидами агента, указанный эффект ВРФ заметно снижался. Кроме того, в присутствии ВРФ было показано ингибирование экспрессии генов основных ферментов, участвующих в образовании эйказаноидов, и уменьшение степени ингибирования при добавлении к клеткам свободного лецитина. Следует отметить, что при введении лецитина вместе с ВРФ практически полностью отсутствовал эффект усиления экспрессии гена *NRF2*, показанный для ВРФ без лецитина.

Важным теоретическим значением диссертационной работы являются исследования механизма активности ВРФ в отношении волоссяных фолликулов. Автором выдвинуто предположение о том, что данная активность обусловлена ингибированием выработки TNFa, который участвует в апоптозе волоссяного фолликула, а также негативно влияет на продукцию фактора роста эндотелия сосудов, играющего важнейшую роль в снабжении фолликула питательными веществами. Подавление выработки TNFa может происходить, в том числе путем активации аденоzinового рецептора, которая была показана автором у мышей, получавших ВРФ при моделировании алопеции.

Представленные автором гипотезы о механизмах биологической активности фуллерена С60, а также исследования, проведенные для обоснования данных гипотез, являются весьма ценными для проведения дальнейших научных работ в данной области знаний.

Теоретическая значимость исследования заключается также в обобщении новых знаний о водном растворе свободного фуллерена С60, его биологических эффектах и обосновании механизмов столь разнообразных активностей ВРФ.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость работы заключается, прежде всего, в том, что представлены данные, свидетельствующие о безопасности ВРФ, полученного по новой технологии. Показано, что однократное и многократное (в течение месяца) введение высококонцентрированного раствора фуллерена С60 мышам не оказывало негативного влияния ни на поведение, ни на внешний вид, ни на состояние органов. Важным научно-практическим значением диссертационной работы является то, что на основе фармакокинетического анализа фуллерена С60 была показана его выводимость из организма с мочой и калом. Доказанное отсутствие токсичности и способности выводиться из организма позволяют устраниить имеющееся существенное препятствие для проведения доклинических и клинических испытаний средств на основе немодифицированного фуллерена С60.

При проведении исследований была показана биологическая активность немодифицированного фуллерена С60, полученного по уникальной технологии. Выявленные эффекты и описание возможных механизмов, лежащих в основе этих эффектов, создали предпосылки для разработки лекарственных средств для терапии различных патологий, что представляет собой научно-практическую значимость и ценность. Была показана перспективность создания на основе ВРФ противовоспалительных лекарственных средств, которые будут иметь ранозаживляющую и противовирусную активность. Были определены перспективы разработки противоаллергических лекарственных средств на основе ВРФ, а также средств для терапии алопеции.

При проведении научных исследований был разработан и оптимизирован целый ряд экспериментальных моделей различных патологий *in vivo* и *in vitro*, что также представляет собой большую научно-практическую ценность, поскольку данные модели могут использоваться для иных исследований, в том числе для анализа биологической активности наночастиц. Представлено в совокупности восемь моделей *in vivo* для изучения разнообразных биологических эффектов соединений, а также ряд *in vitro*

моделей для оценки хемотаксиса макрофагов, способности ВРФ влиять на дифференцировку моноцитов, спектр экспрессируемых генов, а также для изучения взаимодействия с АУР. Представленные модели имеют научно-практическую ценность для изучения молекулярных механизмов биологической активности различных соединений, и могут быть весьма полезны, в том числе для изучения свойств наночастиц. Ценными материалами, представленными в работе, являются также разработанные последовательности праймеров для анализа экспрессии целого спектра патогенетически значимых факторов, участвующих в процессах регенерации, ангиогенеза, воспаления, роста и развития волосяных фолликулов, а также в развитии аллергических патологий.

Важным научно-практическим значением представленной диссертационной работы является прикладной аспект полученных результатов. Опираясь на экспериментальные данные о биологической активности ВРФ, были разработаны и зарегистрированы в качестве косметических средств восстанавливающий крем, обладающий противовоспалительной, ранозаживляющей и противогерпетической активностью, а также спрей для роста волос, который купирует процесс выпадения волос, способствует восстановлению волосяного покрова и улучшает структуру волоса, что подтверждается отзывами, полученными после применения указанных средств.

Представленные в диссертационной работе данные, а также прикладной аспект разработок актуализируют и обосновывают возможность разработки терапевтических средств на основе ВРФ с последующим проведением доклинических и клинических испытаний для внедрения в клиническую практику.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа «Фуллерен С₆₀: механизм биологической активности и разработка подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом» написана в традиционном стиле в соответствии с установленными требованиями. Диссертация описана на 432 страницах и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, раздел результатов исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы. В диссертации представлены 172 рисунка и 42 таблицы. Список литературы содержит 396 источников, в том числе 62 отечественных и 334 зарубежных.

Во введении показана актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые автором на защиту.

Обзор литературы отражает современные представления об известной биологической активности фуллерена, а также данные о его токсичности. Оцениваются

уникальные свойства фуллерена и потенциальные возможности его использования в качестве средства для терапии аллергических заболеваний. Литературный обзор изложен научным языком и логичен.

Материалы и методы исследования подробно описаны и структурированы, обеспечивают современный научно-методологический уровень диссертации.

Третья глава диссертационной работы посвящена детальному описанию всех результатов проведенных исследований, в том числе по биологической активности ВРФ, изучению токсических эффектов, фармакокинетики. Внушительный объем данных представлен по исследованиям механизмов биологической активности ВРФ.

В главе «Обсуждение» автором проведен анализ собственных результатов в сравнении, как с основополагающими работами, так и с современными данными из достаточного количества российских и иностранных источников. Такое детальное и всестороннее сравнение позволило автору подчеркнуть новизну и научно-практическую значимость результатов исследования.

В главе «Заключение» подведены итоги работы над диссертацией, описаны рекомендации для практического применения ВРФ.

Положения и выводы, представленные автором в диссертации, представляют значительный интерес для фундаментальных и прикладных исследований.

Основное содержание диссертационной работы опубликовано в 45 печатных работах, в том числе автор имеет 24 статьи в рецензируемых периодических научных изданиях, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций, 16 публикаций в материалах отечественных и международных научных конгрессов и конференций, 5 патентов.

В работе встречаются стилистические погрешности, не снижающие научно-практической ценности работы. Принципиальных замечаний и вопросов по диссертации нет.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Заключение

Диссертация Шершаковой Надежды Николаевны «Фуллерен C₆₀: механизм биологической активности и разработка подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология, является научно-квалификационным трудом на актуальную тему, в котором на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как решение научной проблемы выявления перспективных

иммуноактивных фармакологических веществ и проведения комплекса их доклинических исследований, создающих бэкграунд для разработки новых подходов к терапии иммунозависимых заболеваний, связанных с окислительным стрессом, что вносит существенный вклад в развитие иммунологии как научной дисциплины.

Таким образом, работа полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции от 26 октября 2023 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Шершакова Надежда Николаевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии
Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), доктор медицинских наук (3.2.7. Иммунология),
профессор  Калюжин Олег

Калюжин Олег Витальевич

Контактная информация: Адрес: 119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2
Телефон: +7 (495) 609-14-00. Сайт: <https://www.sechenov.ru>. Адрес электронной почты:
rectorat@staff.sechenov.ru

