

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по
клинической работе
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Государственный научный
центр «Институт иммунологии»
Федерального
медицинского агентства,
доктор медицинских наук,
профессор


Н.И. Ильина
«16» мая 2023 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»

Федерального медико-биологического агентства
о диссертационной работе 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»

Диссертация «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» выполнена в Федеральном
государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр
«Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства
(ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России). В период подготовки
диссертации соискатель работал в Федеральном государственном
бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт
иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ
Институт иммунологии» ФМБА России).

Соискатель Шершакова Надежда Николаевна, дата рождения: 18.05.1981 г., гражданство Российской Федерации, в 2003 году окончила ветеринарно-биологический факультет Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина по специальности «ветеринарный врач-биофизик». С 2003 по 2006 гг. обучалась в очной аспирантуре по специальности «аллергология и иммунология» в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. В 2006 в диссертационном совете на базе данного института защитила диссертацию по теме «Изучение структурно-функциональных характеристик фермента Таq ДНК-полимеразы с помощью моноклональных антител» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «14.00.36 – аллергология и иммунология».

Научный консультант – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Хайтов Муса Рахимович, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

Слушали:

1. Выступление Шершаковой Н.Н. об основных результатах диссертационной работы.
2. Выступление рецензента д.б.н. Шиловского И.П.
3. Выступление рецензента д.фарм.н. Смирнова В.В.
4. Выступление рецензента д.м.н. Елисютиной О.Г.

По результатам рассмотрения диссертации принято следующее
ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Актуальность исследования

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» посвящена вопросам, имеющим большое научное и научно-практическое значение.

Объектом исследований являлась молекулярная форма углерода - фуллерен C₆₀, который представляет собой абсолютно симметричную молекулу, имеющую сферическую форму и диаметр 0,7 нм, содержащую 60 атомов углерода, которые расположены в вершинах правильных 12 пятиугольников и 20 шестиугольников на поверхности усеченного икосаэдра. Анализ литературы, выпущенной за последние десять лет, показал значительный рост интереса к фуллерену C₆₀ и его производным в области прикладных исследований в сфере биологии и медицины, поскольку данная молекула обладает целым рядом биологических активностей, в том числе противовоспалительной, противоопухолевой, антивирусной, нейропротективной, фотодинамической, мембранотропной, радиопротекторной. Показано, что фуллерен C₆₀ и его соединения, как мощные антиоксиданты, способны эффективно инактивировать синглетный кислород и свободные радикалы. Это свойство делает фуллерен C₆₀ перспективным терапевтическим средством для лечения воспалительных заболеваний, аллергии и других патологий, связанных с окислительным стрессом, сопровождающимся генерацией активных форм кислорода, свободных радикалов и оксида азота. Несмотря на широкий спектр биологических эффектов фуллерена C₆₀, его применение в клинической практике пока не описано. Основным препятствием для использования фуллерена C₆₀ в медицинской практике является практически полная нерастворимость в воде (~ 10–11 мг/л), что обусловлено его высокой гидрофобностью в сочетании с тенденцией к образованию агрегатов, поэтому исследования проводят преимущественно с водорастворимыми производными фуллерена. Кроме того, до сих пор неясными остаются вопросы фармакокинетики и механизма действия получаемых соединений. В ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России была разработана

принципиально новая технология получения водной формы немодифицированного фуллерена С60, которая основана на использовании биосовместимых компонентов и исключает использование токсичных растворителей, ультразвуковую обработку, длительное перемешивание и нагревание. Технология является относительно простой и легко масштабируется, при этом концентрация раствора фуллерена С60 достигает 1 мг/мл, что на порядок выше относительно выходов при иных способах получения подобных дисперсий. Данный аспект позволяет проводить анализ биологической активности именно немодифицированного фуллерена С60, а масштабируемость процесса получения обуславливает перспективность дальнейшего использования, в том числе в клинической практике. Следует отметить, что важным представляется изучение именно немодифицированного фуллерена С60, поскольку любая химическая модификация молекулы обычно сопровождается изменением свойств, в том числе биологических.

Диссертационная работа посвящена изучению биологической активности, безопасности, фармакокинетики водного раствора фуллерена С60, а также определению возможных клеточных мишней взаимодействия для обоснования механизма действия. Диссертация является актуальным и важным исследованием, поскольку ее результаты могут стать основой для разработки новых подходов к терапии заболеваний, вызванных окислительным стрессом.

Соответствие диссертации специальности

Тема диссертационной работы полностью соответствует специальности «3.2.7. Иммунология» (области исследования: №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). Разработка подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом, поиск клеточной мишени в рамках изучения механизма биологической активности фуллерена С60, а также изучение вопросов распределения, выведения и безопасности является актуальной задачей имmunологии, содействует разработке новых средств для терапии воспалительных заболеваний.

Связь темы диссертации с планами ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

Диссертационная работа Шершаковой Н.Н. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ, проводимых ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по теме «Разработка гибридных соединений на основе фуллерена и катионных пептидов как новых антимикробных средств» (шифр: «Фуллерен-21»).

Диссертационная работа была поддержана грантами ФЦП (Соглашение № 8146) «Разработка экспериментальной модели атопического дерматита у мышей для изучения механизмов развития и эффективности новых подходов к терапии данного заболевания»; ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы» (Соглашение № 14.604.21.0059) «Разработка экспериментального образца лечебного препарата на основе водорастворимой формы фуллерена для терапии атопического дерматита»; Минигрант от Фонда «Сколково» (Соглашение № МГ6/17) «Разработка технологии получения водорастворимого фуллерена С60, обладающего противоаллергенной активностью».

Тема диссертации утверждена на заседании секции №2 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, протокол №3 от 25.04.2014 г.

Основные результаты диссертационной работы

Автором было проведено изучение биологической активности водной дисперсии немодифицированного фуллерена С60, ее безопасности, биораспределения, а также осуществлен поиск возможных клеточных мишеней для фуллерена С60 в организме.

Было проведено масштабирование процесса получения водной дисперсии фуллерена С60 путем замены стадии диализа на ультрафильтрацию.

В результате изучения влияния водного раствора фуллерена С60 (ВРФ) при накожном и подкожном способах введения на характер иммунного ответа у мышей с экспериментальным атопическим дерматитом (АД) было показано, что при накожных аппликациях С60 наблюдалось снижение уровня специфических IgE, а также уменьшение соотношения IgG1/IgG2a. Кроме того, не зависимо от способа введения раствора фуллерена уровень экспрессии *IL-4* и *IL-5* снижался. При накожном введении раствора фуллерена С60 наблюдалось также повышение экспрессии *IL-12* и *IFN γ* , что свидетельствовало, по-видимому, о сдвиге иммунного ответа в сторону Th1. Важным результатом исследования стало выявление увеличения экспрессии гена белка филаггрина, который является центральным компонентом эпидерmalного барьера. По результатам гистологического анализа кожи было установлено, что не зависимо от способа введения раствора фуллерена патоморфологические изменения кожи в условиях моделирования АД были выражены слабо. Максимальный терапевтический эффект от применения ВРФ достигался при накожном нанесении.

При моделировании пищевой аллергии анализ клинических, иммунологических и гистологических параметров оценки показал, что введение ВРФ подавлял Th2-иммунный ответ, снижая эозинофилю в тощей кишке тонкого отдела кишечника, а также уменьшая степень проявления аллергической диареи.

В результате оценки способности ВРФ влиять на развитие состояния анафилактического шока, при моделировании данного состояния на мышах, было показано, что введение ВРФ на разных этапах сенсибилизации снижало процент смертности животных. Наилучший результат был получен при введении ВРФ (20 мкг/мышь) на ранних этапах сенсибилизации. Процент смертности при этом снизился на 50%. В ходе экспериментов между экспериментальными группами было выявлено наличие явной корреляции уровня специфического IgE с клиническими проявлениями реакции анафилактического шока и процентом смертности животных.

При моделировании раневого и ожогового поражения кожи у мышей, было показано, что ВРФ способен стимулировать заживление кожного покрова. Патоморфологический анализ гистологических срезов кожи показал, что нанесение фуллерена C60 улучшает гистологическую картину пораженного участка. Анализ изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в процессы регенерации, ангиогенеза и воспаления кожного покрова у мышей при нанесении фуллерена C60 показал увеличение экспрессии генов *HMGB1* и *VEGF-A*, а также подавление экспрессии генов *TNFA*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*.

Исследование влияния ВРФ на рост волос при моделировании алопеции показало наличие способности фуллерена C60 стимулировать активность волосяных фолликул (ВФ) у мышей линии Balb/c и Nu/nu. Визуальная оценка результатов исследования выявила, что при подкожном введении ВРФ эффект стимуляции был сильнее, чем при накожном. Анализ гистологических срезов кожи мышей линии Nu/nu показал, что количество ВФ у животных, получавших ВРФ, было достоверно больше по сравнению с группой, не получавшей терапию. Анализ изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в зарождение, развитие и функционирование волосяных фолликул, показал, что при подкожном введении ВРФ наблюдалось увеличение экспрессии генов *Wnt10B*, *DKK1*, *Srd5a2*, *VEGF-A*, *EGF*, *FGFB* и пониженная экспрессия гена *TNFA*.

Изучение противовирусной активности ВРФ проводилось с использованием модели герпес-вирусной инфекции (ВПГ1) *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что ВРФ предотвращает ВПГ1 инфекцию культуры клеток, обладает способностью нейтрализовать инфекционную активность герпес-вируса, проявляет терапевтические противовирусные свойства в отношении кожной ВПГ1-инфекции у мышей.

В процессе поиска клеточных мишеней для взаимодействия фуллерена С60, была представлена схема, которая иллюстрирует возможный механизм биологической активности фуллерена С60 и может стать основой для дальнейших исследований в данной области. Так, эффекты ВРФ, вероятно, могут быть опосредованы взаимодействием с макрофагами и привлечением их в зону поражения, что играет важную роль в развитии воспаления и процессах заживления. Также было выдвинуто предположение о взаимодействии ВРФ с арил-углеводородным рецептором, с которым тоже могут быть связаны эффекты ВРФ. Была показана способность фуллерена С60 ингибировать экспрессию АУР и цитохромов *CYP1A1* и *CYP1B1* наряду с повышением продукции фактора антиоксидантной защиты *NRF2*.

Изучение острой и хронической токсичности ВРФ при разных способах введения (накожном, подкожном, внутрибрюшинном, интрагастральном и внутривенном) показало отсутствие токсических эффектов. Гибели животных не зафиксировано, снижения веса не происходило. Патологических изменений по показателям периферической крови и гистологическим показателям не выявлено. Однако, в высоких дозах фуллерен С60, будучи инородным, вызывает выраженную макрофагальную реакцию с накоплением в брюшной полости и формированием гранулёмоподобного, но не воспалительного процесса.

Что касается изучения распределения и выведения фуллерена С60, то в рамках исследований было показано, что фуллерен С60 может активно выводиться из организма. Во-первых, через почки, попадая в мочу, и, во вторых, очевидно, через желчные протоки, попадая затем в фекалии.

Наличие его в моче и кале фиксировалось в течение 72 часов. По истечении этого времени даже следовых количеств фуллерена С60 не обнаруживалось. Важно отметить, что степень выведения фуллерена С60 в неизмененном виде составляла, по крайней мере, около 70%. Но не исключено, что часть его выводится также в форме метаболитов путем окисления в печени.

Прикладным аспектом представленных исследований является то, что на основе ВРФ были зарегистрированы крем и спрей для роста волос.

Достоверность результатов диссертационной работы

Эксперименты проведены по стандартизованным методикам, на откалиброванном и сертифицированном оборудовании. В работе использованы современные высокотехнологичные методы анализа, в том числе с применением проточной цитометрии, ПЦР-РВ, ИФА, гистологического анализа, а также ряда подходов для изучения фармакокинетики. Показана воспроизводимость результатов исследований в различных условиях. Все предоставленные в работе результаты основаны на проработке собранного в ходе исследования экспериментального материала. Использованы адекватные современные методики сбора и статистической обработки экспериментальных данных.

Научная новизна

Результаты диссертационной работы обладают несомненной новизной.

Впервые проведено исследование биологической активности немодифицированного фуллерена С60, полученного в высокой концентрации по уникальной биосовместимой масштабируемой технологии.

Впервые выдвинуто предположение относительно способности фуллерена С60 взаимодействовать с арил-углеводородным рецептором.

Впервые выдвинуто предположение о том, что клеточной мишенью для фуллерена С60 в организме могут являться макрофаги, что обуславливает противовоспалительный и ранозаживляющий эффекты данного соединения.

Впервые проведено исследование токсических эффектов немодифицированного фуллерена C60, полученного по уникальной биосовместимой технологии, *in vivo*.

Впервые проведено изучение фармакокинетических характеристик и распределения немодифицированного фуллерена C60 по внутренним органам.

Впервые показана перспективность использования немодифицированного фуллерена C60 при разработке противовоспалительных и противовирусных средств, а также средств для стимуляции роста волос.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в детальном изучении разнообразных биологических эффектов водного раствора фуллерена C60, включая противовоспалительный, ранозаживляющий, противовирусный, а также эффект стимуляции роста волос.

При исследовании получены новые знания о структуре частиц водной дисперсии фуллерена C60, способности фуллерена C60 влиять на экспрессию генов различных сигнальных путей, в том числе участвующих в процессах воспаления, ангиогенеза, аллергии и роста волос. Анализ изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в процессы регенерации, ангиогенеза и воспаления кожного покрова у мышей при нанесении фуллерена C60 показал увеличение экспрессии генов *HMGB1* и *VEGF-A*, и подавление экспрессии генов *TNFA*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*. Анализ изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в зарождение, развитие и функционирование волосяных фолликулов, показал, что при подкожном введении ВРФ наблюдалось увеличение экспрессии генов таких факторов, как *Wnt10b*, *DKK1*, *Srd5a2*, *VEGF-A*, *EGF*, *FGFB* и пониженная экспрессия гена *TNFA*.

При изучении механизма биологической активности фуллерена C60 была изложена и экспериментально изучена гипотеза о возможности

взаимодействия молекул фуллерена C60 с арил-углеводородными рецепторами (АУР). Методом молекулярного докинга были построены модели связывания АУР с фуллереном C60 и показано, что этот лиганд может связываться как во внутренней полости PAS-B, так и в канале E2. В рамках экспериментального подтверждения гипотезы, была показана способность фуллерена C60 влиять на экспрессию АУР, а также АУР-ассоциированных генов, в том числе цитохромов *CYP1A1*, *CYP1B1* и факторов антиоксидантной защиты. Таким образом, была обоснована возможность взаимодействия фуллерена C60 с АУР.

В диссертационной работе предложена гипотеза о возможности взаимодействия молекул фуллерена C60 с макрофагами и способности влиять на их профиль экспрессии генов. В рамках экспериментального подтверждения данной гипотезы было установлено, что фуллерен C60 способен влиять на хемотаксис макрофагов, стимулируя продукцию *CCL2*. Кроме того, было выявлено влияние фуллерена C60 на экспрессию провоспалительных генов макрофагов в процессе их дифференцировки до фенотипа M1 или M2.

Полученные знания позволили существенно приблизиться к пониманию и обоснованию механизма ряда биологических эффектов немодифицированного фуллерена C60, в том числе противовоспалительного и ранозаживляющего.

Изучение токсичности и фармакокинетических параметров молекул C60 позволили доказать его безопасность и способность выводиться из организма через почки и желчные протоки.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практической значимость работы является то, что показанные безопасность и выводимость фуллерена C60 из организма при различных способах введения могут послужить основой для возможности проведения доклинических испытаний препаратов на основе ВРФ, поскольку

неизученность данных вопросов являлась весьма существенным препятствием для такого рода исследований.

Научно-практическую значимость представляют также экспериментальные модели, разработанные и оптимизированные при проведении исследований: модель атопического дерматита *in vivo*, модель пищевой аллергии *in vivo*, модель анафилактического шока *in vivo*, модель алопеции *in vivo*, модель раневого воспаления *in vivo*, модель ожогового воспаления *in vivo*, а также *in vitro* модели дифференцировки макрофагов и оценки хемотаксиса макрофагов. Указанные модели представляют научно-практическую ценность, в частности, для исследователей, изучающих молекулярные механизмы действия различных наноструктур, в том числе создаваемых на основе фуллерена С60. В процессе исследований разработаны последовательности ПЦР-праймеров для оценки экспрессии патогенетически значимых генов при изучении биологической активности ВРФ и поиске его клеточной мишени.

Научно-практическая значимость работы состоит в получении данных о биологической активности водного раствора немодифицированного фуллерена С60, которые указывают на перспективность данного соединения для разработки препаратов для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Так, показанная противовоспалительная и ранозаживляющая активности ВРФ делают его перспективным для терапии раневых и ожоговых воспалений. По результатам оценки противовирусной активности ВРФ, можно говорить о возможности рассматривать данное соединение в качестве кандидатного препарата для терапии герпес-вирусных инфекций. Выявленный эффект стимуляции роста волос создает предпосылки к возможности использовать ВРФ при разработке препаратов для терапии алопеции.

Полученные результаты исследований биологической активности водного раствора немодифицированного фуллерена С60 привели к созданию

на его основе восстанавливающего крема и спрея для роста волос, которые были зарегистрированы в качестве косметических средств.

Масштабированная в ходе работ уникальная технология получения водного раствора фуллерена С60, позволит получать его в промышленных объемах.

В совокупности, полученные в ходе исследования данные должны позволить устранить основные препятствия не только для проведения ДКИ и КИ, но и для дальнейшего использования ВРФ и препаратов на его основе для разработки новых терапевтических средств и внедрения их в клиническую практику.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах:

По материалам диссертации опубликованы 45 печатных работ, в том числе 24 работы в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций («Иммунология», «Вопросы вирусологии», «Медицина экстремальных ситуаций», «Российский аллергологический журнал», «Российский иммунологический журнал», «Nanomedicine», «Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures», «Journal of Nanobiotechnology», «PLoS ONE»); 16 публикаций в материалах научных конгрессов и конференций; 5 патентов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Научные статьи

1. Shershakova N.N., Andreev S.M., Tomchuk A.A., Makarova E.A., Nikonova A.A., Turetskiy E.A., Petukhova O.A., Kamyshnikov O.Y., Ivankov O.I., Kyzyma O.A., Tomchuk O.V., Avdeev M.V., Dvornikov A.S., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by "green technology". Nanomedicine. 2023 V. 47:102619. PP. 15.

2. Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., **Shershakova N.N.**, Kozlov V.V., Permyakova K.Y., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R., Pronin A.V., Kushch A.A. Adjuvant effect of dispersed fullerene C60 on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Vopr Virusol.* 2023. V. 67. № 6. P. 516-526.
3. Галкина А. А., Болякина Д. К., Шатилова А. В., Шатилов А. А., Бабихина М. О., Голомидова А. К., Андреев С. М., **Шершакова Н. Н.**, Хайтов М. Р. Разработка и оценка эффективности ранозаживляющих соединений на основе катионных пептидов и фуллерена. Медицина экстремальных ситуаций. 2023. №3. С. –1-9
4. Порошина А.С., **Шершакова Н.Н.**, Шиловский И.П., Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Гудима Г.О., Хайтов М.Р. Роль ИЛ-25, ИЛ-33 и TSLP в развитии кортикостероидной резистентности. *Иммунология.* 2023. Т. 44. № 4. С. 500–510.
5. Елисютина О.Г., **Шершакова Н.Н.**, Смирнов В.В., Шиловский И.П., Корнеев А.В., Порошина А.С., Смольников Е.В., Литовкина А.О., Феденко Е.С., Кудлай Д.А., Валента Р., Хайтов М.Р. Новые подходы к аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ): разработка рекомбинантной вакцины от аллергии на пыльцу бересклета. *Иммунология.* 2022. Т. 43. № 6. С. 621-631.
6. Tomchuk A.A., Ivankov O.I., Tropin T.V., Tomchuk O.V., Avdeev M.V., Voiteshenko I.S., **Shershakova N.N.**, Andreev S.M., Turetskiy E.A., Khaitov M.R. Comparative structural study of C₆₀-lysine and C₆₀-piperazine biocompatible aqueous solutions, Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2022. V. 30. № 1. P. 27-35.
7. Klimova R., Andreev S., Momotyuk E., Demidova N., Fedorova N., Chernoryzh Y., Yurlov K., Turetskiy E., Baraboshkina E., **Shershakova N.**, Simonov R., Kushch A., Khaitov M., Gintsburg A. Aqueous fullerene C60 solution

- suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections, Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. 2020. V. 28. № 6. P. 487-499.
8. Tomchuk A.A., **Shershakova N.N.**, Andreev S.M., Turetskiy E.A., Ivankov O.I., Kuzyma O.A., Tomchuk O.V., Avdeev M.V. (2020) C60 and C60-arginine aqueous solutions: *In vitro* toxicity and structural study. Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures. V. 28. I. 4. P. 245-249.
9. Андреев С.М., **Шершакова Н.Н.**, Кожихова К.В., Шатилов А.А., Тимофеева А.В., Турецкий Е.А., Кудлай Д.А., Хайтов М.Р. Перспективные соединения из природных источников для терапии COVID-19. Российский аллергологический журнал. 2020. Т. 17. № 2. С. 18-32.
10. **Shershakova N.**, Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshevnikov O., Nikonova A., Khaitov M. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. Journal of Nanobiotechnology. 2016. V. 14. № 1. P. 1483-1493.
11. **Шершакова Н.Н.**, Андреев С.М., Барабошкина Е.Н., Шабанова Д.Д., Макарова Э.А., Хайтов М.Р. Противоаллергические свойства водорастворимой формы фуллерена С60. Иммунология. 2016. Т. 37. № 6. С. 329-331.
12. **Шершакова Н.Н.**, Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Макарова Э.А., Барабошкина Е.Н., Хайтов М.Р. Изучение гемолитической активности водной дисперсии фуллерена С60. Иммунология. 2016. Т. 37. № 4. С. 212-215.
13. **Шершакова Н.Н.**, Барабошкина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Хайтов М.Р. Отсутствие острой токсичности у водного раствора фуллерена С60. Иммунология. 2016. Т. 37. № 6. С. 325-329.
14. Смирнов В.В., Петухов А.Е., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Егоренков Е.А., **Шершакова Н.Н.**, Хайтов М.Р. Количественное определение фуллерена С60 в водных средах. Иммунология. 2016. Т. 37. № 6. С. 343-347.

15. Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev A., Osipova N., **Shershakova N.**, Khaitov M. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method. Simple way to fullerene aqueous solution. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2015, V.23. № 9. P. 792-800.
16. **Shershakova N**, Bashkatova E, Babakhin A, Andreev S, Nikonova A, Shilovsky I, Kamyshnikov O, Buzuk A, Elisutina O, Fedenko E, Khaitov M Allergen-Specific Immunotherapy with Monomeric Allergoid in a Mouse Model of Atopic Dermatitis. *PLoS ONE*. 2015. V. 10. № 8. P. e0135070.
17. Андреев С.М., Башкатова Е.Н., Пургина Д.Д., **Шершакова Н.Н.**, Хайтов М.Р. Фуллерены: биомедицинский аспект. *Иммунология*. 2015. Т. 36. № 1. С. 57-61.
18. Бабахин А.А., **Шершакова Н.Н.**, Ласкин А.А., Камышников О.Ю., Шиловский И.П., Андреев С.М., Львов В.Л., Апарин П.Г., Хайтов М.Р. Аллерген-специфическая иммунотерапия экспериментального атопического дерматита мономерным аллергоидом, адьювантированным экзополисахаридом из *Shigella sonnei*. *Российский иммунологический журнал*. 2015. Т. 9. № 1 (18). С. 121-124.
19. Бабахин А.А., Ласкин А.А., Камышников О.Ю., **Шершакова Н.Н.**, Шиловский И.П., Бержец В.М., Гущин И.С., Хайтов М.Р. Модель экспериментальной бронхиальной астмы, индуцированной у мышей аллергенным экстрактом из клещей домашней пыли *Dematophagoides pteronyssinus*. *Российский аллергологический журнал*. 2015. № 6. С. 25-33.
20. **Шершакова Н.Н.**, Бабахин А.А., Башкатова Е.Н., Камышников О.Ю., Андреев С.М., Шиловский И.П., Хайтов М.Р. Аллергенспецифическая иммунотерапия при экспериментальном атопическом дерматите. *Иммунология*. 2014. Т. 35. № 3. С. 155-160.
21. Бабахин А.А., **Шершакова Н.Н.**, Ласкин А.А., Камышников О.Ю., Шиловский И.П., Андреев С.М., Львов В.Л., Апарин П.Г., Хайтов М.Р. Иммунопатология: патогенез и диагностика аллергических,

аутоиммунных, лимфопролиферативных заболеваний и иммунодефицитов. Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8. № 3 (17). С. 503-505.

22. Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Башкатова Е.Н., Елисютина О.Г., Хайтов М.Р. Комбинированная сенсибилизация при моделировании атопического дерматита. Российский аллергологический журнал. 2012. № 1. С. 293-294.
23. Башкатова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Шиловский И.П., Хайтов М.Р. Разработка препаратов, подавляющих аллергическое воспаление, и их тестирование в модели гиперчувствительности замедленного типа. Синтез и изучение эффектов катионных аддуктов фуллерена C60. Российский аллергологический журнал. 2012. № S5. С. 19-20.
24. Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Елисютина О.Г., Хайтов М.Р. Атопический дерматит: экспериментальные модели для изучения патогенеза и разработки новых методов лечения. Российский аллергологический журнал. 2011. № 6. С. 3-11.

Публикации в материалах конгрессов и конференций

25. Ковылкова С.Ю., Брылина В.Е., Шершакова Н.Н. Влияние фуллерена C60 на профиль экспрессии генов цитокинов дифференцированных клеток линии THP-1. В сборнике: Биология и биотехнология на службе охраны здоровья животных и человека. Материалы Национальной научно-практической конференции молодых ученых. Москва. 2022. С. 22-29.
26. Turetskiy E., Shershakova N., Andreev S., Makarova E., Bashkatova E., Shatilov A., Kozhikhova K., Timofeeva A., Kutakhina K., Khaitov M. Fullerene C60 aqueous dispersions exhibits anti-inflammatory activity in murine model of chemical burn. Allergy. 2019. V. 74. P. 539-540.
27. Shershakova N.N.; Klimova R., Momotyuk E., Demidova N., Andreev S., Baraboshkina E., Turetskiy E., Kushch A., Khaitov M., Gintsburg A., Kozhikhova K. Aqueous dispersion of fullerene C60 suppresses the herpes simplex virus 1 infection in vitro and in vivo. Allergy. 2019. V. 74. P. 280.

28. **Shershakova N.**, Klimova R., Momotyuk E., Demidova N., Andreev S., Fedorova N., Chernoryzh Y., Yurlov K., Baraboshkina E., Turetskiy E., Kushch A., Khaitov M., Gintzburg A. Aqueous dispersion of fullerene C60 anti-HCMV and anti- HSV1 activity. ACNS-2019. 2019. P. 309.
29. Андреев С.М., Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Федорова Н.Е., Симонов Р.А., Чернорыж Я.Ю., Юрлов К.С., Турецкий Е.А., **Шершакова Н.Н.**, Хайтов М.Р., Гинцбург А. Л., Кущ А.А. Водный раствор фуллерена C60 эффективно подавляет герпетические инфекции. Современная химическая физика. XXXI Симпозиум. Туапсе. 2019. Сборник аннотаций С. 54
30. Турецкий Е.А., Андреев С.М., **Шершакова Н.Н.**, Чадова Н.Н., Передеряев О.И., Смирнов В.В. Биологические свойства фуллерена C60 и его производных. Естественные и технические науки. 2019. № 9 (135). С. 109-117.
31. **Shershakova N.N.**, Kuks E.N., Baraboshkina E.N., Turetskiy E.A., Kamishnikov O.J., Andreev S.M., Khaitov M.R. Fullerene C60 reduces the allergic inflammation in food allergy mouse model. Allergy. 2018. V. 73. S105. P. 787.
32. Андреев С.М., **Шершакова Н.Н.**, Барабошкина Е.Н., Хайтов М.Р. Водорастворимый фуллерен C60: получение и иммунобиологические свойства В сборнике: Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы IX международного конгресса. 2017. С. 251-253.
33. Bashkatova E., **Shershakova N.**, Shabanova D., Andreev S., Khaitov M. Water-soluble fullerene C60 stimulates filaggrin expression. Allergy. 2017. Т. 72. № S103. С. 442.
34. **Shershakova N.**, Baraboshkina E., Shabanova D.D., Makarova E.A., Andreev S.M., Khaitov M.R. Aqueous fullerene C60 dispersion reduces the risk of lethal anaphylactic hypersensitivity in mice. Allergy. 2017. Т. 72. № S103. С. 477.
35. Барабошкина Е.Н., **Шершакова Н.Н.**, Шабанова Д.Д., Андреев С.М., Хайтов М.Р. Изучение иммуномодулирующих свойств и оценка

- токсического эффекта водорастворимого фуллерена C60. В сборнике: Иммунология сегодня: традиции и инновации. 2016. С. 5-6.
36. Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Шатилов А.А., Барабошкина Е.Н., **Шершакова Н.Н.**, Хайтов М.Р. Диспергирование фуллерена в водной среде приводит к его гидроксилированию и появлению защитной оболочки вокруг сформировавшихся кластеров. В книге: Современная химическая физика Сборник тезисов XXVIII Симпозиума. 2016. С. 149.
37. Макарова Э.А., **Шершакова Н.Н.**, Андреев С.М., Хайтов М.Р. Влияние водной дисперсии фуллерена C60 на аллергическое воспаление В сборнике: Иммунология сегодня: традиции и инновации. 2016. С. 10-11.
38. **Shershakova N.**, Bashkatova E., Purgina D., Makarova E., Andreev S., Khaitov M. Wound healing and anti-inflammatory effects of aqueous fullerene C60 dispersion Allergy. 2016. Т. 71. № S102. С. 315.
39. **Shershakova N.**, Babakhin A., Bashkatova E., Kamishnikov O., Shilovsky I., Andreev S., Khaitov M. Experimental allergen immunotherapy with monomeric allergoid in a mouse model of atopic dermatitis. 2014. Allergy. 69. S99. P.70-1.
40. Bashkatova E., **Shershakova N.**, Purgina D., Andreev S., Khaitov M. The fullerene C60 aqueous dispersion displayed anti-inflammatory activity in mouse model of atopic dermatitis. 2014. Allergy. 69 (Suppl. 99). P. 236-237.
- ### Патенты
41. Патент 2630561, RUS Способ получения водно-солевых дисперсий фуллерена.— № 2015145015; заявл. 20.10.2015; опубл. 2017.
42. Патент 2641041, RUS Композиция для терапии атопического дерматита на основе фуллерена.— № 2016149440; заявл. 15.12.2016; опубл. 2018.
43. Патент 2641091, RUS Применение водно-солевого раствора фуллерена C60 в качестве терапевтического средства при заболеваниях атопическим дерматитом.— № 2016149439; заявл. 15.12.2016; опубл. 2018.
44. Патент 2679257, RUS Способ получения высококонцентрированного водного раствора фуллерена — № 2018101687/05(002206), заявл. 17.01.2018, опубл. 2019.

45. Патент 2694754, RUS Противовирусная активность водного раствора фуллерена — № 2018136488, заявл. 16.10.2018, опубл. 2019.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на:

1. Ежегодных конгрессах Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (EAACI) (2012 г., Женева, Швейцария; 2013 г., Милан, Италия; 2014 г., Копенгаген, Дания; 2015 г., Барселона, Испания; 2016 г., Вена, Австрия; 2017 г., Хельсинки, Финляндия; 2018 г., Мюнхен, Германия; 2019 г., Лиссабон, Португалия; 2021 г., Краков, Польша; 2022 г., Прага, Чехия);
2. 14-ой Международной конференции «Современные углеродные наноструктуры» (ACNS-2019) (1-5 июля 2019, Санкт-Петербург, Россия);
3. XXXI Симпозиуме «Современная химическая физика». (16-25 сентября 2019, Туапсе, Россия);
4. Второй Московской конференции по молекулярной аллергологии (ММАМ - 2019) (19 ноября 2019 г., Москва, Россия);
5. Первом конгрессе по молекулярной аллергологии (МАС – 2020) (1- 2 декабря 2020 г., Москва, Россия);
6. Ежегодных Международных конгрессах по молекулярной иммунологии и аллергологии (IMAC) (2- 3 декабря 2021 г., Москва, Россия; 1-2 декабря 2022 г., Москва, Россия).

Ученый совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- Разработана научная концепция о механизме действия фуллерена C60, которая позволяет объединить и расширить имеющиеся знания в данной области, а также является основой для поиска новых мишеней взаимодействия фуллерена C60 в организме;
- предложена оригинальная научная гипотеза о возможности взаимодействия молекул фуллерена C60 с макрофагами и способности влиять на их профиль экспрессии генов, а также гипотеза о возможности

взаимодействия молекул фуллерена С60 с арил-углеводородными рецепторами (АУР);

- доказана перспективность идеи о создании новых препаратов на основе ВРФ для терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом, а также наличие закономерности изменения профиля экспрессии генов макрофагов при совместной инкубации ВРФ с лецитином: уменьшение эффекта снижения экспрессии генов провоспалительных цитокинов и ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов в присутствии ВРФ;
- введено изменение трактовки механизма противовоспалительной активности фуллерена С60: эффекты фуллерена С60 связаны не только с наличием антиоксидантной активности, но и с его способностью воздействовать на макрофаги.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- доказано влияние фуллерена С60 на экспрессию генов, кодирующих факторы, участвующие в патогенезе аллергических заболеваний, раневых поражений и алопеции. Эти данные вносят вклад в расширение представлений о механизме действия фуллерена С60, а также о его влиянии на отдельные сигнальные пути;
- применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования, в том числе методов выделения, культивирования и стимуляции клеток, а также ИФА, ОТ-ПЦР в реальном времени, проточной цитометрии, анализа характера поляризации макрофагов, анализа фармакокинетических параметров, моделирования *in vivo* атопического экспериментального дерматита, экспериментальной пищевой аллергии, состояния анафилактического шока, алопеции, экспериментальных раневого и ожогового воспалений и др.;
- изложены экспериментальные доказательства безопасности и биологической активности немодифицированного фуллерена С60,

полученного по уникальной технологии, а также выведения молекул фуллерена С60 из организма;

- раскрыты существенные проявления гипотезы об участии фуллерена С60 в процессах регенерации и воспаления: фуллерен С60 способствует привлечению макрофагов, а также способен влиять на выработку ими провоспалительных цитокинов и ферментов, участвующих в образовании эйкозаноидов;

- изучена связь между изменением фенотипа макрофагов в присутствии ВРФ и снижением продукции ими фактора некроза опухоли, экспрессии провоспалительных цитокинов, а также циклооксигеназ и липоксигеназ;

- проведена модернизация метода получения водного раствора немодифицированного фуллерена С60 путем замены стадии диализа на ультрафильтрацию, что обеспечило его масштабируемость.

Значение полученных результатов для практики подтверждается тем, что:

- разработана и внедрена технология масштабирования способа получения водного раствора фуллерена С60, не имеющая аналогов в мире (получен 1 патент);

- определены перспективы практического использования водного раствора немодифицированного фуллерена С60 для разработки новых препаратов для терапии аллергии (получен 1 патент), герпес-вирусных инфекций (получен 1 патент) и алопеции;

- созданы и зарегистрированы композиция крема и спрея для роста волос на основе водного раствора фуллерена С60 (декларация о соответствии ЕАЭС N RU Д-RU.PA05.B.31256/22 от 03.09.2022; декларация о соответствии ЕАЭС N RU Д-RU.PA02.B.79800/21 от 22.11.2021);

- представлены предложения по дальнейшему совершенствованию подходов к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом;

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- результаты получены на сертифицированном и откалиброванном оборудовании, эксперименты проведены по стандартизованным методикам, показана воспроизводимость результатов исследований в различных условиях;
- теория построена на доказанных, проверяемых фактах, согласуется с общепринятым представлениями о подходах к терапии заболеваний, связанных с окислительным стрессом;
- идея базируется на обобщении передового опыта исследователей по рассматриваемой тематике, в том числе знаний в области изучения механизмов биологической активности фуллерена С60 и его производных;
- использовано сравнение полученных автором данных и данных отечественных и зарубежных исследований по рассматриваемой тематике;
- установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике;
- использованы современные методики сбора и обработки экспериментальных данных; объем проведенных исследований достаточен для выработки обоснованных заключений.

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации:

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования, непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах, личном участии в апробации результатов исследования, в непосредственном личном участии в экспериментальных исследованиях, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, подготовке основных публикаций по теме выполненных работ.

Соответствие диссертации предъявляемым требованиям и рекомендация к защите

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» охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформы, основной идейной линии, концептуальностью и взаимосвязанностью выводов.

Диссертационная работа изложена на 432 страницах текста, содержит 42 таблицы, 172 рисунка. Диссертационная работа написана в традиционном стиле и включает в себя следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы. Библиография включает 396 источников, в том числе, 62 отечественных и 334 зарубежных.

Положительная оценка диссертации вытекает из ее актуальности, достоверности полученных результатов, их научной новизны, теоретической и научно-практической значимости, обоснованности выводов.

Исходя из вышеперечисленного, постановили:

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, которые могут быть квалифицированы как крупное научное достижение в области иммунологии: установлена нетоксичность ВРФ; доказана способность фуллерена С60 выводиться через почки и с желчью; доказана биологическая

активность водного раствора немодифицированного фуллерена С60, в частности, противовоспалительная, противовирусная, заживляющая; доказана способность ВРФ стимулировать рост волос; описаны механизмы противовоспалительной и ранозаживляющей активности водного раствора немодифицированного фуллерена С60; доказано, что ВРФ является перспективным соединением для создания на его основе лекарственных средств для терапии ран и ожогов, а также воспалительных и вирусных заболеваний; в качестве действующего вещества, ВРФ включен в доклинические испытания противоаллергического лекарственного средства, а также кандидатного лекарственного средства для терапии алопеции.

Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335) и может быть представлена к защите в специализированном диссертационном совете.

Заключение принято на заседании секции №1 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Присутствовало на заседании 12 из 12 членов секции, в том числе 6 докторов наук, 6 кандидатов наук по специальности рассматриваемой диссертации. Результаты голосования: «за» - 12 человек, «против» - 0 человек, «воздержалось» - 0 человек, протокол №6 от «16» ноября 2023 г.

Председателя секции №1 Ученого совета

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»

ФМБА России, к.м.н.



А.И. Мартынов

16.11.23



Секретарь секции, к.м.н.

Подпись *Мартинов А.И. Малкина Е.Ю.*

ЗАВЕРЯЮ	
Учёный секретарь ФГБУ	
“ГНЦ Институт иммунологии”	
ФМБА России	
Власов А.А.	
16 ноября 2023 г.	

Е.Ю. Малкина

16.11.23