

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента**

**доктора биологических наук Анисимовой Натальи Юрьевны  
на диссертацию Галкиной Анастасии Андреевны  
«Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности  
соединений на основе фуллерена C<sub>60</sub> и катионных пептидов»  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности «3.2.7. Иммунология»**

### **Актуальность исследования**

Несмотря на наличие в настоящее время большого количества методов и средств с антимикробной активностью, инфекционные заболевания продолжают оставаться серьезной угрозой для здоровья населения во всем мире, занимая 3-4 месте в рейтинге причин смертности в соответствии с данными ВОЗ. Особую тревогу вызывает распространение резистентных штаммов микроорганизмов. Считается, что порядка 70% внутригоспитальных инфекций вызваны штаммами, которые устойчивы к одному или нескольким антибиотикам. Наиболее прогностически неблагоприятная ситуация развивается у пациентов при эндотоксемии, индуцирующей каскад системной воспалительной реакции (ССВР) с развитием сепсисоподобного синдрома, сепсиса или септического шока, органной и полиорганной недостаточности с последующим летальным синдромом. Гетерогенность течения сепсиса требует применения в лечении пациентов комплексного многопрофильного подхода. При этом, учитывая значимую роль иммунных реакций в развитии этого состояния, особое место следует отвести иммуностимулирующим методам и средствам, блокирующим развитие ССВР за счет активации противовоспалительного иммунного ответа. Таким образом, очевидно, что на сегодняшний день, существует насущная потребность в разработке новых препаратов для лечения инфекционных заболеваний с принципиально иным механизмом действия.

Перспективным направлением является создание комбинированных соединений, объединяющих несколько терапевтических функций в одной молекулярной платформе. В частности, катионные антибактериальные пептиды рассматриваются как одна из наиболее многообещающих альтернатив традиционным антибиотикам, поскольку развитие резистентности к ним маловероятно из-за их механизма действия. Для усиления стабильности соединений и расширения спектра их биологической активности было предложено использовать наноплатформу на основе фуллерена C<sub>60</sub> для создания комплекса с катионными пептидами.

Таким образом, диссертационная работа Галкиной А.А. на тему «Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности соединений на основе фуллерена C<sub>60</sub> и катионных пептидов» является весьма актуальным исследованием.

### **Соответствие темы диссертационной работы паспорту научной специальности**

Тема диссертации Галкиной Анастасии Андреевны соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направление исследований № №3: Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты. Направление исследований №4: Исследование роли иммунных механизмов в различных физиологических процессах (регенерации, репродукции, старении, нейроэндокринных взаимодействиях, взаимодействии с микробиомом и др.). Направление исследований №5: Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний. Направление исследований №6: Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов).

### **Основные результаты диссертационной работы**

В ходе исследования проведен скрининг панели из 35 оригинальных катионных пептидов (заряд +2...+16, молекулярная масса <5 кДа). Продемонстрирована их антибактериальная активность в отношении лабораторного штамма *E. coli* Dh5 $\alpha$ , а также угнетение колониеобразования ряда патогенных штаммов нескольких видов бактерий под действием наиболее активных представителей, на фоне низкой цитотоксичности относительно различных соматических клеток и, в том числе, фибробластов.

На основе наиболее активных пептидов (КК-46, ST-10, АВ-14, АВ-17, АВ-18) и фуллерена C<sub>60</sub> были синтезированы комбинированные соединения (ковалентные и нековалентные). Девять из них ингибировали рост *E. coli* Dh5 $\alpha$ , причем соединения К14, К17 и К18 показали наибольшую эффективность (МБК преимущественно до 0,15 мМ) и активность против клинически значимых микробных патогенов.

Была продемонстрирована противовоспалительная активность комплексов на основе предварительно отобранных соединений и фуллерена C<sub>60</sub> в модели эндотоксического шока у мышей. Наиболее значимое подавление экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Tnfa*, *Il1b*) и стимуляция экспрессии генов противовоспалительных цитокинов (*Il10*, *Il1rn*) отмечены для комплексов К17 и

К18. На основании анализа баланса цитокиновых соотношений (*Il10/Tnfa*, *Il1rn/Il1b*) был сделан вывод о повышении вероятности выживаемости животных при применении комплексов К17 и К18.

На модели кожной раны *in vivo* установлено наличие ранозаживляющего эффекта у части комбинированных соединений. Применение комплекса К18 приводило к подавлению экспрессии генов ключевых провоспалительных маркеров (*Il1a*, *Il1b*, *Tnfa*, *Il6*) и одновременно стимулировало экспрессию генов противовоспалительных и прорепаративных факторов (*Il10*, *Tgfb1*). Также наблюдалась модуляция экспрессии генов ангиогенеза (*Vegfa*, *Fgfb*, *Egf*) и маркера Т-регуляторных клеток *Foxp3*, что свидетельствовало о купировании воспалительного процесса.

По результатам проведенных испытаний был сделан вывод, что наиболее перспективным кандидатным соединением разработанного ряда является комплекс К18, благодаря сочетанию антибактериальной, противовоспалительной и ранозаживляющей активности. Результаты данной работы обосновывают целесообразность разработки на его основе препаратов комплексного действия для дополнения или замены традиционной комбинированной терапии.

### **Достоверность полученных результатов**

Исходные данные были получены автором на высокотехнологичном оборудовании, с использованием разнообразных современных методов исследования. Для обеспечения надежности полученных данных эксперименты были проведены в необходимом количестве повторов с использованием контрольных образцов или групп животных. Обработка данных выполнена с применением адекватных методов непараметрических статистических критериев. Все это, в совокупности, обеспечило достоверность результатов диссертационного исследования.

### **Научная новизна диссертационной работы**

Новизна работы Галкиной А.А. заключается в том, что автором были получены и комплексно изучены комбинированные соединения нового класса на основе фуллерена С60 и катионных антибактериальных пептидов.

Впервые описаны оригинальные катионные пептиды с уникальной структурой, которые демонстрируют антибактериальную активность относительно полирезистентных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Был впервые разработан подход к созданию стабильных комбинированных соединений, в которых наночастица (фуллерен С60) ковалентно или нековалентно связана с биологически активным пептидом. Далее была охарактеризована эффективность полученных соединений *in vivo*. В частности, было показано, что

комплексы фуллерена C60 и катионных пептидов способны предотвращать гибель животных при моделировании эндотоксического шока, что указывает на их высокий терапевтический потенциал для лечения критических состояний, обусловленных сепсисом или сепсисоподобным синдромом. Обнаружено, что биологическая активность комплексов фуллерена C60 зависит от структуры катионного пептида. Впервые было продемонстрировано, что фуллерен C60, даже будучи в составе комплекса с крупной биомолекулой, не теряет своей способности влиять на экспрессию генов, кодирующих противовоспалительные цитокины.

### **Теоретическая значимость диссертационной работы**

С позиций фундаментальной науки, значимость представленной работы заключается в установлении и описании новых причинно-следственных связей между биологическим действием комбинированных соединений на основе фуллерена C60 и катионных пептидов и молекулярными механизмами, регулируемыми иммунный ответ и репарацию тканей.

Проведенное исследование позволяет утверждать, что на модели эндотоксического шока фуллерен C60 проявляет выраженный протективный эффект, предотвращая гибель животных. При этом, было выявлено, что данный эффект сопровождался активацией противовоспалительного иммунного ответа. В частности, отмечали подавление экспрессии гена *Il1b*.

Важным теоретико-методологическим достижением является демонстрация принципиальной возможности конструирования полифункциональных комбинированных молекул. Возможность сохранения и потенциального усиления биологической активности в комплексах с катионными пептидами (K14, K18) закладывает теоретический фундамент для нового направления – целенаправленного дизайна комбинированных нанофармакологических агентов с заданным профилем активности.

Автором получены данные, свидетельствующие о сохранении способности фуллерена C60 ускорять репарацию тканей в составе комбинированных соединений. Показано, что этот процесс опосредован комплексным воздействием на экспрессию генов: ингибированием провоспалительных цитокинов (*Il1a*, *Il1b*, *Tnfa*, *Il6*), активацией цитокинов, стимулирующих реэпителизацию (*Il10*, *Tgfb1*), а также модуляцией генов, ассоциированных с ангиогенезом и кислородным гомеостазом (*Hif1a*, *Flg*, *Adora2a*, *Vegfa*, *Fgf2*, *Egf*).

Таким образом, результаты исследования вносят весомый вклад в теоретико-методологическую базу разработки новых комбинированных препаратов с противовоспалительной и регенеративной активностью, предназначенных для терапии состояний, осложненных бактериальной инфекцией.

## **Научно-практическая значимость диссертационной работы**

В ходе выполнения данной научной работы автором был получен ряд новых комбинированных соединений и разработана методологическая платформа для их направленного получения. Эти результаты могут быть использованы с целью разработки подходов для лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов.

Важным достижением автора следует считать установление количественных зависимостей «структура-активность» для полученных комбинированных соединений. Эти выводы могут быть использованы для целенаправленного дизайна новых лекарственных соединений.

В ходе работы было доказано, что созданные комбинированные соединения обладают комплексным фармакологическим действием, что обуславливает широкие перспективы их применения для лечения различных заболеваний.

В работе описаны разработанные автором модели *in vivo*, пригодные для изучения противовоспалительной и ранозаживляющей активности различных соединений.

Таким образом, полученные автором результаты формируют задел для продолжения исследований разработанных комплексных соединений в рамках полного цикла доклинических и клинических испытаний.

## **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Галкиной А.А. изложена на 271 странице текста и имеет традиционную структуру: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, анализ полученных результатов, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Диссертация содержит 87 рисунков и 22 таблицы. Библиография включает 308 источников, из них 20 русскоязычных и 288 иностранных.

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне и отличается целостностью и логичностью структуры. Все разделы исследования логически взаимосвязаны и последовательно раскрывают путь от постановки научной проблемы к получению и анализу конкретных результатов.

В разделе «Обзор литературы» автором работы осуществлен системный анализ современных достижений в области исследуемой проблемы. Раздел написан логично, доступным языком. Автором структурированы данные, раскрывающие патофизиологические основы развития острых воспалительных реакций, специфику патогенеза сепсиса и эндотоксического шока, а также молекулярные аспекты регенерации раневых повреждений. В обзоре изложены существующие стратегии терапии воспалительных заболеваний, особое внимание уделено описанию биологической активности фуллерена C<sub>60</sub>, в частности, его

противовоспалительного и регенеративного потенциала. Приведена систематизация антимикробных пептидов, описаны механизмы их действия и современные тенденции в конструировании их конъюгатов с наночастицами.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит описание плана исследований, который охватывает все этапы работы – от получения исследуемых соединений до проведения экспериментов *in vivo*. Методология включает в себя описание синтеза и очистки катионных пептидов, приготовление стабильных дисперсий фуллерена C<sub>60</sub> в водной среде и последующее конструирование их гибридов и комплексов. Описаны использованные клеточные линии и бактериальные штаммы, микробиологические подходы, МТТ-тест, а также экспериментальные модели LPS-индуцированного шока и хирургической раны.

В разделе «Результаты» автором описаны и проиллюстрированы полученные данные. В частности, охарактеризован синтез катионных пептидов, данные по исследованию их антибактериальной и цитотоксической активности, а также по созданию и оптимизации их гибридов и комплексов с фуллереном C<sub>60</sub> с описанием их свойств в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В разделе «Обсуждение» представлен детальный анализ полученных экспериментальных данных в сравнении с результатами других исследователей. В том числе, охарактеризовано влияние комбинированных соединений на выживаемость животных и экспрессию генов цитокинов в условиях эндотоксического шока, а также на экспрессию генов, связанных с репарацией кожи, проанализирована их бактерицидная активность в отношении тест-культур микроорганизмов.

В заключительной части работы сформулированы обобщающие положения и выводы, которые соответствуют обозначенным цели и задачам исследования.

Материалы диссертационного исследования оформлены в полном соответствии с актуальными нормативными требованиями.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 13 печатных работах, в том числе 5 статьях в рецензируемых научных журналах, которые включены в перечень периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций, 3 патентах и 5 публикациях в материалах конгрессов и конференций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Критических недостатков в работе не обнаружено, однако имеются следующие вопросы и замечания.

1. Почему в качестве биологической модели для оценки цитотоксической активности фуллерена C<sub>60</sub>, катионных пептидов и комплексов на их основе, наряду с фибробластами, использовали линии опухолевых клеток?

2. Каков предполагаемый механизм взаимодействия с клетками молекул фуллерена C<sub>60</sub> и комплексов на его основе?
3. Чем можно объяснить более слабый эффект воздействия фуллерена C<sub>60</sub> на фибробласты в сравнении с эффектом воздействия на опухолевые клетки?
4. Почему для оценки результатов системного воздействия комплексов на основе фуллерена и катионных пептидов на индукцию про- и противовоспалительных цитокинов, изученных на модели эндотоксического шока, использовали материал из внутренних органов лабораторных животных?
5. Чем обоснован вывод о перспективности использования комплексов на основе фуллерена и катионных пептидов в качестве основы ранозаживляющих мазей, если применение мази, содержащей только фуллерен, обеспечивало более выраженный эффект восстановления кожного покрова?
6. Рекомендация использования при моделировании эндотоксического шока *in vivo* генетически однородных животных одного пола, возраста и массы тела, содержащихся в идентичных условиях не менее 7 дней до начала эксперимента, представляется излишней вследствие того, что это общепризнанное стандартное условие проведения экспериментов *in vivo*.

В тексте работы имеется ряд стилистических недочетов, которые не носят принципиального характера и не отражаются на общей положительной оценке диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Галкиной А.А. «Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности соединений на основе фуллерена C<sub>60</sub> и катионных пептидов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научных задач, имеющих важное значение для развития иммунологии: были разработаны новые комбинированные соединения, сочетающие противовоспалительную и ранозаживляющую активности фуллерена C<sub>60</sub> и выраженную бактерицидную активность катионных пептидов; на основании полученных результатов сделан вывод о целесообразности использования указанных соединений для создания новых препаратов, предназначенных для терапии сочетанных микробно-воспалительных заболеваний; установлена перспективность применения комбинированных соединений на основе фуллерена C<sub>60</sub> и катионных пептидов в отношении

инфекций, вызванных штаммами бактерий с множественной лекарственной устойчивостью.

Диссертационная работа Галкиной А.А. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в ред. постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. №1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г. №415, 26.10.2023 г. №1786, от 26.01.2023 г. №101, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 №1382), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Официальный оппонент,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории клеточного иммунитета  
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
доктор биологических наук

Анисимова Н.Ю.

Подпись д.б.н., Анисимовой Н.Ю. заверяю

Ученый секретарь, к.м.н.

«24» октябрь 2025 г.



Кубасова И.Ю.

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 115522, Российская Федерация, г. Москва, Каширское ш., д. 24

Тел.: +7 (499) 444-24-24, e-mail: info@ronc.ru, сайт: https://www.ronc.ru