

ОТЗЫВ

официального оппонента члена-корреспондента РАН, профессора, доктора биологических наук Гребенниковой Татьяны Владимировны на диссертацию Галкиной Анастасии Андреевны «Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности соединений на основе фуллерена C₆₀ и катионных пептидов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология»

Актуальность исследования

Согласно прогнозам Всемирной организации здравоохранения, воспалительные заболевания к середине XXI века станут основной причиной глобальной смертности, что обусловлено не только их распространенностью, но и высоким риском развития жизнеугрожающих осложнений. Ключевой проблемой остается сепсис, летальность при котором достигает 30–50 % даже в развитых странах, а также присоединение вторичных бактериальных инфекций на фоне роста антибиотикорезистентности. До 70% клинических изолятов *Staphylococcus aureus* демонстрируют устойчивость к β -лактамным антибиотикам, что существенно ограничивает выбор эффективных лекарственных средств.

Современные протоколы лечения, включая применение глюкокортикостероидов, не устраняют патогенетические причины гипервоспаления, а длительная иммуносупрессия повышает риск развития рецидивирующих инфекций. В этом контексте в качестве альтернативного подхода к терапии предлагается использование наноструктур на основе фуллерена C₆₀ и катионных антибактериальных пептидов. Фуллерен C₆₀, ингибируя продукцию провоспалительных медиаторов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерлейкин-6 (IL-6), способен блокировать воспалительные сигнальные каскады. Одновременно фуллерен C₆₀ стимулирует репаративные процессы за счет усиления экспрессии генов, ассоциированных с ангиогенезом и реэпителизацией, что сокращает сроки заживления ран — критического фактора при профилактике бактериальной инвазии. В свою очередь, катионные пептиды воздействуют на эволюционно консервативные мишени бактериальных патогенов, такие как липидный бислой мембраны, что минимизирует риск формирования резистентности.

Данная работа направлена на разработку инновационных лекарственных средств, обладающих противовоспалительным, ранозаживляющим и антибактериальным действием.

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

Исследование посвящено разработке и анализу биологической активности конъюгатов и комплексов на основе фуллерена C₆₀ и синтетических антимикробных пептидов, демонстрирующих противовоспалительное, антибактериальное и регенеративное действие.

Была проведена оценка антибактериальной активности панели из 35 синтетических катионных пептидов, 5 из которых были отобраны для дальнейшего исследования. Было показано, что выбранные пептиды были эффективны не только в отношении лабораторного штамма кишечной палочки, но также патогенных штаммов грамположительных и грамотрицательных видов бактерий, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью.

На основе отобранных пептидов были получены конъюгаты и комплексы с фуллереном C₆₀. Установлено, что электростатические комплексы (K14, K17, K18) сохраняют активность исходных компонентов при низких бактерицидных концентрациях

(преимущественно 0,029–0,14 мМ), проявляя минимальную токсичность (до 2000 мкг/мл).

На моделях эндотоксического шока *in vivo* было показано, что применение электростатических комплексов фуллерена C60 и антимикробных пептидов предотвращает гибель животных (липополисахарид в дозе LD100), предположительно, за счет модуляции цитокинового баланса (*Il1rn/Il1b*, *Il10/Tnfa*). В рамках изучения ранозаживляющей активности полученных соединений на модели неинфицированного раневого дефекта кожи у мышей было выявлено, что комплексы фуллерена C60 с отдельными пептидами ускоряют заживление ран, вероятно, за счет подавления экспрессии генов провоспалительных цитокинов, а также стимуляции экспрессии генов факторов с прорегенеративной активностью.

Проведенное исследование позволило установить, что комплекс K18 и фуллерена C60 демонстрирует наиболее выраженный терапевтический эффект, что обусловлено комбинацией антибактериального действия пептида АВ-18 и противовоспалительной и регенеративной активностями фуллерена C60. Полученные результаты позволяют продолжить исследования для разработки кандидатных лекарственных препаратов с расширенным спектром биологической активности, предназначенных для коррекции воспалительного ответа и стимуляции репаративных процессов в раневых очагах, в том числе осложненных бактериальной контаминацией.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа Галкиной А.А. выполнена на высоком научно-методологическом уровне. Эксперименты выполнены в достаточном количестве повторностей и обработаны с применением стандартных методов статистического анализа. Полученные экспериментальные данные достоверны. Выводы работы сформулированы в соответствии с полученными результатами, обоснованы и соответствуют поставленным задачам, имеют строгую доказательную базу, подтвержденную результатами исследований, и коррелируют с данными, представленными в авторитетных независимых источниках. Результаты диссертационной работы Галкиной А.А. представлены в ведущих иностранных и отечественных журналах, а также на международных и всероссийских научных конференциях.

Научная новизна диссертационной работы

Важным достижением диссертационной работы является описание катионных пептидов с уникальным минокислотным составом, обладающих высокой бактерицидной активностью против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, в частности, штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

Были впервые получены принципиально новые комбинированные соединения на основе фуллерена C₆₀ и катионных пептидов, сочетающие противовоспалительное и антимикробное действие. Автором была впервые доказана терапевтическая эффективность этих комплексов, включая их способность предотвращать летальный исход животных при моделировании эндотоксического шока *in vivo*. Также впервые установлено, что регенеративная активность фуллерена C₆₀ в составе комбинированных соединений зависит от структуры связанного пептида. Впервые показано, что образование комплексов с пептидами не нарушает способности фуллерена модулировать экспрессию генов, вовлеченных в воспаление и заживление ран.

Научная новизна исследования подтверждена, включением полученных результатов в три патенты Российской Федерации: № RU2837372C, № RU2841634C1 и № RU2841633C1.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Диссертационная работа Галкиной А.А. вносит существенный вклад в понимание молекулярных механизмов эндотоксического шока, расширяя современные представления о регуляции провоспалительных (IL-1 β , TNF- α , IL-6) и противовоспалительных (IL-1RA, IL-10) цитокинов на ранних стадиях системного воспаления, раскрыта ключевая роль IFN- γ - и аденозиновых (A_{2a}AR) сигнальных путей в этом процессе.

Установлена прогностическая значимость ранней (1 час) экспрессии гена *Il1rn* при LPS-индуцированном воспалении, коррелирующая с благоприятным исходом септического шока. Выявленные противовоспалительные и регенеративные свойства комплексов фуллерена C₆₀ с катионными пептидами открывают перспективу научно-обоснованных подходов для разработки ранозаживляющих лекарственных препаратов.

Полученные данные углубляют фундаментальные знания о генетической регуляции воспалительного ответа и регенерации, формируя теоретическую основу для

разработки полифункциональных терапевтических средств против бактериального воспаления.

Разработанные модели эндотоксического шока (нелетальная и летальная формы) представляют универсальный инструмент для изучения системного воспаления и доклинической оценки новых препаратов. Результаты исследования имеют значительный образовательный потенциал и могут быть использованы в учебных программах и научных публикациях.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Научно-практическую ценность диссертационная работа Галкиной А.А. состоит в разработке подходов к созданию принципиально нового класса терапевтических средств на основе конъюгатов и комплексов фуллерена C₆₀ и антимикробных пептидов. Разработанные кандидатные соединения сочетают выраженные антибактериальные, противовоспалительные и регенеративные свойства, в том числе в отношении бактериальных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

Существенным практическим результатом стало создание валидированных экспериментальных моделей эндотоксического шока различной степени тяжести, которые могут служить эффективным инструментом для доклинической оценки новых лекарственных средств.

Представленные данные открывают перспективы для разработки инновационных комбинированных препаратов для терапии воспалительных процессов бактериальной этиологии. Разработанные методологические принципы могут быть экстраполированы на создание других классов терапевтических наноматериалов с заданными биологическими свойствами.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Галкиной А. А. «Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности соединений на основе фуллерена C₆₀ и катионных пептидов» изложена на 271 странице машинописного текста и проиллюстрирована 87 рисунками и 22 таблицами. Работа включает «Введение», четыре главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», а

также «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Список использованной литературы включает 308 источников, в том числе 20 отечественных и 288 зарубежных.

Вводная часть исследования содержит обоснование актуальности выбранной темы, четкую формулировку целей и задач работы, а также детальный анализ современного состояния изучаемой проблемы в научной литературе. В данном разделе представлены элементы научной новизны, раскрыта теоретическая и практическая значимость проведенного исследования, описана методология работы. Также обоснована достоверность полученных результатов, определен личный вклад автора и охарактеризована структура диссертационного исследования.

«Обзор литературы» состоит из 8 разделов и демонстрирует комплексный анализ современных научных данных, касающихся ключевых аспектов изучаемой проблемы. В обзоре систематизированы сведения о патофизиологических механизмах развития острого воспаления, особенностях патогенеза септических состояний и эндотоксического шока, а также молекулярных основах раневого процесса. Автор провел анализ существующих терапевтических подходов к лечению воспалительных заболеваний, подробно рассмотрел биологическую активность фуллерена C₆₀, включая его противовоспалительные и регенеративные свойства. Значительное внимание уделено классификации антимикробных пептидов и механизмам их действия, а также современным исследованиям в области создания конъюгатов наночастиц с антимикробными пептидами. «Обзор литературы» заканчивается заключением, обобщающем приведенные данные.

Глава «Материалы и методы исследования», содержит описание экспериментальной части работы. В нем представлены методики получения водной дисперсии фуллерена C₆₀, синтеза катионных пептидов и их комбинированных соединений, условия культивирования бактериальных и эукариотических клеточных культур. Детально описаны примененные микробиологические методы исследования, включая метод диффузии в агар, метод серийных разведений и подсчет колониеобразующих единиц. Особое внимание уделено разработанным автором экспериментальным моделям LPS-индуцированного шока различной степени тяжести и модели кожного раневого процесса.

Глава «Результаты» исследования отражают комплексный подход к решению поставленных задач. В работе последовательно представлены данные по молекулярному

дизайну и синтезу катионных пептидов, оценке их антибактериальной активности и цитотоксических свойств. Подробно описана разработанная методика получения и оптимизации условий формирования комбинированных соединений на основе фуллерена C₆₀. Особый научный интерес представляют результаты изучения биологической активности полученных комплексов, включая их антибактериальную эффективность, цитотоксический профиль и противовоспалительные свойства в моделях эндотоксического шока. Завершающим этапом стало исследование регенеративного потенциала разработанных соединений на модели кожного раневого процесса.

В главе «Обсуждение» проведен анализ полученных экспериментальных данных. Особое внимание уделено влиянию комбинированных соединений на показатели выживаемости экспериментальных животных и экспрессию генов цитокинов при моделировании эндотоксического шока. Рассмотрены механизмы воздействия разработанных комплексов на экспрессию генов, участвующих в процессах кожной регенерации. Проанализированы данные по бактерицидной активности катионных пептидов и их комплексов в отношении различных микроорганизмов.

«Заключение» содержит обобщение полученных результатов и аргументированные выводы, соответствующие поставленным задачам исследования.

Выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований, соответствуют поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту.

Рукопись диссертации и автореферат оформлены в соответствии с требованиями ГОСТ.

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.

В работе имеется ряд опечаток и недочетов. В качестве недочета можно указать, что в «Материалах и методах» при описании эксперимента с животными не указано число животных в группах. В таблице 6 «Материалов и методов» перепутаны значения температуры денатурации и элонгации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет.

Есть вопросы уточняющего характера, на которые хотелось бы получить ответы в процессе защиты:

1. Какую функциональную роль играет фуллерен в комплексах, является ли он пассивным носителем, или он может влиять на кинетику высвобождения пептида, его устойчивость к протеазам, механизм взаимодействия с мембраной? Каким образом выбран диапазон концентраций?
2. При оценки противовоспалительной активности комбинированных соединений на модели состояния эндотоксического шока *in vivo*, дексаметазон используется как «положительный контроль», в летальной модели он показывает 100% выживаемость животных, но при этом худшее восстановление веса. Как это можно объяснить?
3. Хотелось бы знать мнение автора, какой вклад в наблюдаемый противовоспалительный эффект вносит сам фуллерен, а какой – пептид?

Заключение

Диссертационная работа Галкиной А.А. «Изучение противовоспалительной и антибактериальной активности соединений на основе фуллерена C₆₀ и катионных пептидов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей важное значение для развития иммунологии: получены инновационные соединения с комплексной биологической активностью на основе фуллерена C₆₀ и синтетических антибактериальных пептидов; продемонстрированы их противовоспалительная, регенеративная и антибактериальная активности; доказано, что полученные конъюгаты и комплексы являются перспективной основой новых терапевтических средств для лечения воспалительных заболеваний, отягощенных присоединением бактериальной инфекции.

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,
заместитель директора по научной работе
Института вирусологии им. Д. И. Ивановского,
руководитель испытательного центра,
руководитель лаборатории молекулярной диагностики
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук, профессор

Гребенникова Т.В.

Подпись члена-корреспондента РАН, д.б.н., профессора Гребенниковой Т.В. заверяю:

Ученый секретарь, к.б.н.

« 24 » октябрь 2025 г.

Сысолятина Е.В.



Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 123098, Российская Федерация, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18

Тел.: +7 (499) 193-30-01, e-mail: info@gamaleya.org, сайт: <https://gamaleya.org>