

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения

«Государственный научный центр
«Институт иммунологии» Федерального
медико-биологического агентства,
академик РАН, д.м.н.,

профессор

М.Р. Хаитов

« 03 » июня 2025 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Федерального медико-биологического агентства

о диссертационной работе 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»

Соискатель Галкина Анастасия Андреевна, 08.12.1996 года рождения, гражданство Российской Федерации, в 2020 году с отличием окончила магистратуру ветеринарно-биологического факультета Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина по специальности «биология». С 2020 по 2023 год обучалась в очной аспирантуре по специальности «30.06.01 Фундаментальная медицина» в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА

России). В период подготовки диссертации работала в должности младшего научного сотрудника в лаборатории адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

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

Научный руководитель – доктор биологических наук, Шершакова Надежда Николаевна, заведующая лабораторией адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России).

Слушали:

1. Выступление Галкиной А.А. об основных результатах диссертационной работы.
2. Выступление рецензента д.м.н. Пащенко М.В.
3. Выступление рецензента д.б.н. Кофиади И.А.

По результатам рассмотрения диссертации принято следующее

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевания воспалительного характера станут наиболее распространенной причиной смерти в течение следующих трех десятилетий.

Воспаление — это защитная реакция организма, направленная на устранение патогенов и восстановление гомеостаза. Избыточное и неконтролируемое воспаление может привести к повреждению тканей и дисфункции органов. Большинство методов лечения острых воспалительных заболеваний базируются на купировании боли и поддерживающем лечении, а использование распространенных лекарственных препаратов часто сопровождается серьезными побочными эффектами. В связи с этим существует необходимость в разработке новых методов лечения воспалительных заболеваний.

В настоящее время активно изучаются перспективы использования водного раствора фуллерена C₆₀ в качестве противовоспалительного агента. Фуллерен C₆₀ способен подавлять как неаллергические, так и аллергические воспаления, что отличает его от большинства известных противовоспалительных препаратов. Показана способность водной дисперсии фуллерена C₆₀ подавлять развитие воспаления *in vivo* и эффективность в качестве сопутствующей терапии для заживления ран.

Осознание значимости инфекционно-септических осложнений при воспалительных заболеваниях стимулировало повышенный интерес к созданию терапевтических средств, направленных на борьбу с такими осложнениями, в частности, к разработке новых препаратов, обладающих комбинированным действием, а именно противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью. Способность

микроорганизмов развивать резистентность к лекарственным средствам является основным недостатком классических антибактериальных препаратов, поскольку значительно снижает эффективность терапии. Одними из наиболее перспективных альтернативных агентов с антибактериальной активностью являются катионные пептиды (КП).

Пептиды, как правило, обладают низкой стабильностью *in vivo*, а развитие резистентности к ним маловероятно из-за их механизма действия, направленного на консервативные мишени бактериальных мембран или внутриклеточных процессов. В связи с этим, фуллерен C₆₀ может быть использован как средство доставки для пептидного компонента при формировании стабильного комплекса, не вызывающего развитие лекарственной устойчивости у бактерий.

Таким образом, разработка комбинированных соединений на основе фуллерена C₆₀ и катионных пептидов с противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью является актуальным направлением исследований.

Полученные в ходе данной работы результаты расширяют понимание фундаментальных принципов и механизмов противовоспалительной активности фуллерена, а также имеют прикладное значение относительно разработки терапевтических препаратов на основе фуллерена C₆₀ с расширенным спектром биологической активности.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертации полностью соответствует специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: №3 – Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противогрибковой, противопаразитарной иммунной защиты; №4 – Исследование роли иммунных механизмов в различных физиологических процессах (регенерации, репродукции, старении,

нейроэндокринных взаимодействиях, взаимодействии с микробиомом и др.);
№5 – Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний;
№6 – Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов).

Степень разработанности темы исследования

За последние годы накоплено значительное количество данных о биологической активности производных фуллеренов, в частности фуллерена C₆₀. Выявлено, что конъюгаты и комплексы на основе фуллеренов и аминокислот или пептидов могут обладать широким спектром активностей: антиоксидантной, антибактериальной, мембранотропной, противовирусной, противоопухолевой, нейропротекторной и фотодинамической. Отмечаются перспективы использования водного раствора фуллерена C₆₀ в качестве противовоспалительного средства. Множество зарубежных и отечественных патентов и публикаций по получению органических производных на основе фуллерена подтверждают заинтересованность исследователей в создании и изучении комбинированных соединений на основе фуллеренов. Важно отметить, что большая часть исследований освещает вопросы, связанные с водорастворимыми функционализированными производными фуллерена и лишь в малой степени затрагивает водорастворимые формы немодифицированного фуллерена C₆₀.

Ранее коллективом авторов ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России было показано, что создание новых препаратов на основе водорастворимой формы фуллерена C₆₀ является перспективным подходом к терапии воспалительных заболеваний, в том числе при раневом поражении кожи. Также на базе института осуществляются разработка и получение

производных фуллерена C₆₀ с аминокислотами и пептидами, в том числе обладающими антибактериальной активностью.

В настоящее время активно изучаются катионные антибактериальные пептиды: количество публикаций в базе данных PubMed, соответствующих ключевым словам «антимикробные пептиды» и «пептиды защиты хозяина», возросло от 500 в 2000 году до 3500-4000 в 2019-2023 годах, чему способствовала пандемия COVID-19. На момент 2022 года было зарегистрировано около 70 пептидных препаратов (14 зарегистрировано в России), однако ни для одного из них бактериальные инфекции не были заявлены как область клинического применения.

Анализ научной литературы позволил выявить в данной области исследования ряд аспектов, которые требуют изучения, и которые мы попытались изучить в нашей работе:

- способность водорастворимой формы немодифицированного фуллерена C₆₀ проявлять противовоспалительную активность на моделях *in vivo*;
- механизмы биологического действия водорастворимой формы фуллерена C₆₀ отчасти остаются неясными и требуется, например, понимание того, как фуллерен C₆₀ способен влиять на выработку про- и противовоспалительных факторов *in vivo*;
- влияние биологически активных пептидов и фуллерена C₆₀ на активность друг друга в составе комбинированных соединений.

Поиск решения обозначенных вопросов обуславливает актуальность настоящего диссертационного исследования.

Цель исследования

Изучить противовоспалительную, ранозаживляющую и антибактериальную активность комбинированных соединений на основе фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов.

Задачи исследования:

1. Оценить способность оригинальных катионных пептидов проявлять антибактериальную и цитотоксическую активность *in vitro*;
2. Оценить способность оригинальных катионных пептидов сохранять антибактериальную активность в составе комбинированных соединений с фуллереном C60 *in vitro*;
3. Изучить противовоспалительную активность комбинированных соединений фуллерена C60 и оригинальных катионных пептидов *in vivo* при моделировании состояния эндотоксического шока;
4. Оценить влияние комбинированных соединений фуллерена C60 и оригинальных катионных пептидов на экспрессию генов патогенетически значимых факторов, участвующих в развитии воспаления;
5. Изучить способность комбинированных соединений фуллерена C60 и оригинальных катионных пептидов проявлять ранозаживляющую активность на модели раневого воспаления *in vivo*;
6. Оценить влияние комбинированных соединений фуллерена C60 и оригинальных катионных пептидов на экспрессию генов факторов, участвующих в процессе ранозаживления.

Положения, выносимые на защиту

Комбинированные соединения фуллерена C60 и оригинальных синтетических катионных пептидов обладают противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностями.

Противовоспалительную и ранозаживляющую активность комбинированных соединений фуллерена C60 определяет структура входящих в их состав катионных пептидов.

Комбинированные соединения фуллерена C60 и катионных пептидов являются перспективной основой для создания безопасных препаратов для

терапии воспалительных заболеваний, осложненных бактериальной инфекцией.

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

Диссертационная работа Галкиной А.А. выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ, проводимых ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, в рамках государственного задания ФМБА «Разработка гибридных соединений на основе фуллерена и катионных пептидов как новых антимикробных средств», шифр: «Фуллерен-21» (код 612.017.1:616.9).

Тема диссертации была утверждена на заседании секции №1 Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России) (протокол №2 от 28.04.2025 г.).

Основные результаты диссертационной работы

На первом этапе исследования автором была протестирована панель из 35 оригинальных катионных пептидов. Большинство пептидов имели заряд от +2 до +16 и молекулярную массу не более 5 кДа. Показано, что: 15 пептидов обладали антибактериальной активностью в отношении лабораторного штамма *E. coli* Dh5 α ; 3 пептида - в отношении патогенных штаммов *E. coli* 4sR, 4sI, 4s (значения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) не более 0,14 mM); 2 пептида – в отношении штаммов *S. aureus*, *P. aeruginosa* PAO (значения МБК составили не более 0,7 mM), а также в отношении полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*, *S. agalactiae* и *K. pneumoniae* (значения МБК не более 0,7 mM); 1 пептид – в отношении полирезистентного штамма *A. baumannii* (МБК 0,029 mM). Выявлено, что

пептиды с наиболее выраженной бактерицидной активностью не обладают цитотоксическим действием на здоровые клетки млекопитающих в диапазоне концентраций 20-174 мкг/мл.

На основе оригинальных катионных пептидов, проявивших наибольшую антибактериальную активность (КК-46, ST-10, АВ-14, АВ-17 и АВ-18), и фуллерена С60 были получены комбинированные соединения, различающиеся типами связей образующих их элементов (ковалентные и нековалентные). Установлено, что 9 соединений были способны в разной степени ингибировать рост штамма *E. coli* Dh5 α , а также демонстрировали бактерицидную активность в отношении данного штамма (значения МБК не более 0,9 mM). Показано, что комбинированные соединения К14, К17 и К18 обладали более выраженной бактерицидной активностью в отношении *E. coli* Dh5 α (МБК составили 0,0070 mM, 0,1508 mM и 0,0290 mM, соответственно) в сравнении с другими соединениями, а также подавляли рост колоний патогенных штаммов *E. coli* (МБК не более 0,14 mM). Комбинированные соединения К14 и К18 подавляли рост следующих клинически-значимых патогенов: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. agalactiae* и *K. pneumoniae* (МБК не более 0,7 mM), а также сохраняли бактерицидную активность в отношении полирезистентных штаммов. К14 проявлял бактерицидную активность в отношении *A. baumannii* (МБК 0,029 mM). Оценка цитотоксичности данных соединений показала, что они демонстрируют профиль безопасности на уровне или лучше, чем у исходных пептидов.

На основе данных, полученных по завершении первого этапа исследования, комбинированные соединения К14, К17 и К18 были отобраны для оценки противовоспалительной активности. На модели состояния эндотоксического шока было показано, что профилактическое внутрибрюшинное введение растворов фуллерена С60 и всех комплексов за 24 часа и 1 час до введения эндотоксина способствует выживаемости мышей.

Полученные в ходе исследования данные говорят о том, что фуллерен С60 и комбинированные соединения на его основе проявляли противовоспалительную активность в легких, почках и печени животных, подавляя развитие системного воспаления. Соединения К14 и К17 подавляли экспрессию гена *Tnfa* в тканях легких, почек и печени, в то время как тенденция к снижению экспрессии *Tnfa* в ответ на введение водного раствора фуллерена С60 (ВРФ) и К18 наблюдалась только в почках. Понижение экспрессии *Il1b* в легких и печени наблюдалось в ответ на введение ВРФ и К18. Комбинированные соединения в разной степени влияли на экспрессию *Il6*. Так, были выявлены тенденция к понижению экспрессии указанного гена в легких и тренд к повышению экспрессии в тканях почек, что, вероятно, было обусловлено специфической особенностью органов. Результаты исследования показали, что введение животным при моделировании состояния эндотоксического шока ВРФ и К18 способствовало восстановлению функции клеток-продуцентов IFN- γ вырабатывать данный цитокин. Было выявлено, что ВРФ и комбинированные соединения К14 и К18 стимулировали экспрессию гена противовоспалительного цитокина IL-10 (*Il10*) во всех исследованных органах, а также стимулировали экспрессию *Il1rn*. Было показано, что фуллерен С60 и К18 были способны влиять на экспрессию гена рецептора аденозина *Adora2a*.

Соотношения *Il10/Tnfa* и *Il1rn/Il1b* были посчитаны для предсказания риска летального исхода при развитии состояния эндотоксического шока, где повышение соотношения *Il10/Tnfa* было напрямую связано с неблагоприятным исходом, а повышение соотношения *Il1rn/Il1b* – с благоприятным исходом заболевания. Результаты оценки соотношений *Il10/Tnfa* и *Il1rn/Il1b* для легких, почек и печени показали, что животные, получавшие К17 и К18, имели наиболее высокие шансы выжить. На основании данных по летальности и экспрессии генов провоспалительных и

противовоспалительных цитокинов, можно сделать вывод, что наиболее выраженной противовоспалительной активностью среди комбинированных соединений обладают K17 и K18.

В проведенных экспериментах на модели кожной раны *in vivo* показано, что проявление ранозаживляющей активности фуллерена C60 в составе комбинированных соединений с катионными пептидами зависит от самого пептида.

Так, например, фуллерен C60 сохранял свою ранозаживляющую активность в составе комбинированного соединения ASM-45, однако в составе ASM-46 катионный пептид ST-10 оказывал негативное действие на способность фуллерена C60 интенсифицировать заживление ран. Было показано, что ежедневное нанесение мазевой композиции на основе пептида ST-10 на поверхность кожной раны приводило к замедлению регенерации тканей, что, вероятно, было связано со структурными особенностями пептида.

По совокупности представленных данных можно сделать вывод, что фуллерен C60 и комбинированные соединения K14 и K18 подавляли экспрессию провоспалительных цитокинов. Терапия ВРФ и K18 стимулировала экспрессию гена *Hmgb1*, тем самым снижая риск образования рубцовой ткани на месте повреждения кожи. Было выяснено, что фуллерен C60 и соединения K14 и K18 подавляли экспрессию генов провоспалительных цитокинов (*Il1a*, *Il1b* и *Tnfa*). Использование ВРФ и K18 достоверно снижало экспрессию *Il6*, а терапия ВРФ и K18, но не K14, стимулировала экспрессию *Il10* и *Tgfb1* в коже, способствуя эпителизации и заживлению ран без рубцов. Выявлено, что терапия мазью на основе фуллерена C60 и комбинированных соединений K14 и K18 приводила к снижению уровня экспрессии *Hif1a* на 11-й день после поражения кожи, вследствие чего наблюдалось снижение уровней экспрессии генов факторов

ангиогенеза (*Vegfa*, *Fgfb* и *Egf*). В пользу вывода о купированном воспалении в коже животных групп ВРФ, К14 и К18 также говорит пониженная экспрессия гена *Foxp3*, кодирующего маркер регуляторных Т-лимфоцитов.

Таким образом, было показано, что фуллерен С60 сохранял свою ранозаживляющую активность в составе комбинированных соединений с оригинальными катионными пептидами АВ-14 и АВ-18.

В связи с вышеизложенным можно сделать вывод, что наиболее перспективным для использования при раневом поражении кожи является комбинированное соединение К18. Полученные результаты подтверждают возможность создания лекарственных средств одновременно с антибактериальной, противовоспалительной и ранозаживляющей активностями на основе катионных пептидов и фуллерена С60, которые могут стать экономически и практически более выгодной заменой комплексной терапии, традиционно используемой при лечении ран и других патологий, осложненных бактериальной инфекцией.

Достоверность результатов диссертационной работы

Приведённые в диссертации данные получены с использованием современного оборудования, прошедшего своевременную поверку и зарегистрированного в Реестре средств измерения. Достоверность представленных результатов определяется достаточным для статистического анализа количеством наблюдений, четко сформулированными целью и задачами, использованием информативных методов исследования, адекватных поставленным задачам. В ходе работы были применены адекватные методы математической статистики. Установлено, что результаты диссертационной работы являются достоверными.

Научная новизна работы

Впервые получены катионные пептиды с уникальными аминокислотными последовательностями, обладающие выраженной антибактериальной активностью в отношении грам-положительных и грам-отрицательных бактерий.

Впервые созданы комбинированные соединения фуллерена C₆₀ и оригинальных катионных пептидов, проявляющие противовоспалительную и антибактериальную активность.

Впервые продемонстрирована способность водного раствора фуллерена C₆₀ и его комбинированных соединений с катионными пептидами препятствовать гибели мышей при моделировании состояния эндотоксического шока.

Впервые установлено, что способность фуллерена C₆₀ проявлять регенеративную активность в составе комбинированных соединений может меняться в зависимости от структуры катионного пептида.

Впервые показано, что фуллерен C₆₀ сохраняет свою способность влиять на экспрессию генов патогенетически значимых факторов, участвующих в развитии воспаления и ранозаживлении, в составе комплекса с катионными пептидами.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования определяется получением новых знаний о биологических механизмах действия ВРФ в составе новых комбинированных соединений на воспаление и процессы регенерации. Так, было выявлено, что фуллерен C₆₀ способствует выживаемости мышей при развитии эндотоксического шока, что сопровождается подавлением экспрессии гена *Ilb* и повышением экспрессии *Ilrn*, и сохраняет данную способность в составе комплексов с катионными пептидами. Проведенные

исследования показали наличие способности фуллерена C60, в том числе в составе комплексов (K14 и K18) ускорять процесс ранозаживления посредством подавления экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*Il1a*, *Il1b*, *Tnfa*, *Il6*), индукции генов цитокинов, влияющих на реэпителизацию (*Il10*, *Tgfb1*), влияния на гены кислородного баланса и ангиогенеза (*Hif1a*, *Flg*, *Adora2a*, *Vegfa*, *Fgf2*, *Egf*).

Исследование обогащает теоретическую научную базу разработки новых комбинированных соединений с множественной активностью для оптимизации подходов к терапии воспалительных заболеваний, осложненных бактериальной инфекцией. Результаты проведенного исследования вносят вклад в общую теоретико-методологическую базу о перспективах применения комбинированных соединений фуллерена C60 и катионных пептидов и создания подобных средств.

Полученные результаты исследований расширяют современные представления об участии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на ранних этапах развития состояния эндотоксического шока, в частности IL-1RA, IFN- γ и A2aAR. Были подтверждены данные об опосредованном липополисахаридом (LPS) подавлении экспрессии генов *Ifng* и *Adora2a* при развитии состояния эндотоксического шока. Показано, что повышенная экспрессия гена *Il1rn* через 1 час после введения LPS является предиктором позитивного прогноза при развитии септического шока.

Научно-практическая значимость работы

Научно-практическая значимость работы заключается в формулировании и экспериментальном обосновании принципиально нового подхода к терапии инфекционно-воспалительных заболеваний на основе комбинированных соединений фуллерена C60 и антибактериальных пептидов. Полученные соединения демонстрируют выраженную активность

в отношении клинически значимых патогенов, включая полирезистентные штаммы.

Описаны протоколы получения конъюгатов и комплексов, гарантирующие сохранение биологической активности их компонентов и формирующие универсальную платформу для создания новых препаратов путем модификации пептидной структуры или присоединения к фуллерену других биомолекул. Исследование влияния структурных особенностей фуллерена C₆₀ и пептидов на их биологическую активность в комбинированных соединениях создает основу для разработки новых молекул с заданными свойствами и активностью.

Описаны модели эндотоксического шока и хирургической полнокожной раны *in vivo* для самок мышей линии BALB/c, пригодные для изучения противовоспалительной и ранозаживляющей активности различных соединений.

Комбинированные соединения представляют собой основу для создания новых высокоэффективных лекарственных средств для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний. Их ключевыми преимуществами являются: широкий спектр антибактериального действия; комплексное воздействие на инфекцию, воспаление и ранозаживление; сниженный риск развития резистентности. Полученные данные *in vivo* являются основой для планирования доклинических и клинических исследований. Разработанные протоколы способны ускорить процесс создания лекарственных форм, а модификация пептидов позволит направленно получать соединения с усиленной активностью против конкретных патогенов, улучшенной селективностью и оптимизированной фармакокинетикой.

Таким образом, работа вносит существенный вклад в фундаментальные аспекты преодоления антибиотикорезистентности и разработки комбинированных соединений, предоставляет конкретные методологии и

создает перспективную основу для разработки новых препаратов с расширенным спектром биологической активности, способных значительно улучшить лечение тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний.

Практические рекомендации

1. Для оценки антибактериальной активности катионных пептидов и их комплексов с фуллереном C₆₀, способных изменять оптическую плотность среды, рекомендуется применять метод подсчета колоний.
2. Для минимизации вариабельности индивидуальных реакций при моделировании эндотоксического шока *in vivo* рекомендуется использовать стандартизированный липополисахарид одной серии, а также генетически однородных животных одного пола, возраста и массы тела, содержащихся в идентичных условиях не менее 7 дней до начала эксперимента.
3. Рекомендуется перед основным исследованием проводить предварительное титрование LPS для конкретной партии животных с определением летальной или расчетом рабочей дозы с коррекцией на массу тела каждого животного.

Внедрение результатов исследования в практику

Методики триметилсилилирования аминокислот и оценки цитотоксической активности комбинированных соединений, описанные в настоящем исследовании, были внедрены в работу ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. В рамках диссертационной работы было получено 3 патента на изобретение. Патент на оригинальные пептидные последовательности (RU2837372C1) защищает использованные в данной работе синтетические антибактериальные пептиды АВ-14, АВ-17 и АВ-18. Патент RU2841634C1 охватывает конъюгаты фуллерена C₆₀ и катионных пептидов ASM-45 и ASM-46, а патент RU2841633C1 распространяется на комплексы фуллерена C₆₀ и катионных пептидов K14, K17 и K18.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Предметом дальнейших исследований является: изучение бактерицидной активности описанных в работе катионных пептидов и комбинированных соединений с фуллереном C₆₀ на их основе в отношении расширенной панели штаммов клинически-значимых видов бактерий; изучение влияния комбинированных соединений на экспрессию генов расширенного спектра факторов, участвующих в процессе развития системного воспаления, на модели эндотоксического шока *in vivo*; изучение экспрессии генов факторов воспаления при других схемах введения тестируемых соединений; изучение влияния комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и антибактериальных пептидов на экспрессию генов, участвующих в развитии системного воспаления, на разных этапах развития эндотоксического шока, а также влияния самих используемых катионных пептидов на экспрессию генов данных факторов; оценка уровня экспрессии генов, участвующих в воспалительном ответе, в макрофагах при развитии эндотоксического шока *in vivo*; изучение расширенного спектра биологической активности комбинированных соединений на модели инфицированной раны *in vivo*.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 13 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых периодических научных изданиях, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук; получено 3 патента; опубликовано 5 публикаций в сборниках материалов конференций.

Список статей, опубликованных по теме диссертации:

1. **Галкина, А.А.** Разработка и оценка эффективности ранозаживляющих соединений на основе катионных пептидов и фуллерена / **А.А. Галкина, Д.К. Болякина, А.В. Шатилова, А.А. Шатилов, М.О. Бабихина, А.К. Голомидова, С.М. Андреев, Н.Н. Шершакова, М.Р. Хаитов** // Медицина экстремальных ситуаций. – 2023. – №3. – С. 56-64. DOI: 10.47183/mes.2023.036
2. **Галкина, А.А.** Катионные пептиды как перспективные соединения для терапии бактериальных осложнений при атопическом дерматите: оценка антибактериальной активности / **А.А. Галкина, Д.К. Болякина, А.В. Шатилова, А.А. Шатилов, М.О. Бабихина, А.К. Голомидова, А.А. Никонова, С.М. Андреев, Д.А. Кудлай, Н.Н. Шершакова, М.Р. Хаитов** // Российский Аллергологический Журнал. – 2023. – Т. 20. – №4. – С. 387-401. DOI: 10.36691/RJA15038
3. **Петрова, Н.В.** Антианафилактические эффекты технологически обработанных антител к МНС II / **Н.В. Петрова, С.А. Тарасов, А.А. Галкина, А.С. Порошина, М.С. Сундукова, В.В. Смирнов** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 175. – № 6. – С. 801-803. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-6-763-766
4. **Ковалева, Е.В.** Доклиническое изучение репродуктивной токсичности лекарственного средства на основе водного раствора фуллерена C₆₀, предназначенного для терапии пищевой аллергии / **Е.В. Ковалева, Ю.В. Иванова, Н.М. Онацкий, В.А. Шангараева, Д.С. Горшенин, Е.Н. Барабошкина, А.А. Галкина, Д.К. Болякина, В.А. Паршина, Р.А. Курмашева, Н.Н. Шершакова, Л.В. Михина, М.Р. Хаитов** // Российский Аллергологический Журнал. – 2025. – Т. 22. – № 2. – С. 153-164. DOI: 10.36691/RJA16986

5. **Галкина, А.А.** Создание ранозаживляющих препаратов на основе антибактериальных катионных пептидов и фуллерена C60 / А.А. Галкина, Н.Н. Шершакова, М.В. Ходжава, Д.К. Болякина, А.К. Голомидова, О.О. Колоскова, Д.С. Горшенин, С.М. Андреев, Г.О. Гудима, Д.А. Кудлай, М.Р. Хаитов // Иммунология. – 2025. – Т. 46. – № 3. – С. 289–300. DOI: 10.33029/1816-2134-2025-46-3-289-300

Патенты:

1. Патент № 2837372, RUS Авторы: Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Шатилов А.А., Шатилова А.В., **Галкина А.А.**, Хаитов М.Р. Пептиды, обладающие антибактериальной активностью. Заявитель: ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. - № 2024110651; заявл. 18.04.2024 опубл. 31.03.2025.

2. Патент № 2841633, RUS Авторы: Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Шатилов А.А., Шатилова А.В., **Галкина А.А.**, Турецкий Е.А., Хаитов М.Р. Гибридные соединения на основе фуллерена C60 и катионных пептидов в качестве противомикробного средства (варианты). Заявитель: ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. - № 2024114964; заявл. 31.05.2024 опубл. 11.06.2025.

3. Патент № 2841634, RUS Авторы: Шершакова Н.Н., Андреев С.М., Шатилов А.А., Шатилова А.В., **Галкина А.А.**, Турецкий Е.А., Хаитов М.Р. Гибридные соединения на основе фуллерене C60 и катионных пептидов в качестве противомикробного средства. Заявитель: ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. - № 2024114964; заявл. 31.05.2024 опубл. 11.06.2025.

Публикации в материалах научных конгрессов и конференций:

1. **Galkina, A.A.** Fullerene C60 and its derivatives: study of the toxic effect / **A.A. Galkina**, N.N. Shershakova, S.M. Andreev, E.A. Turetskiy, M.R. Khaitov // Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Hybrid Congress, 10-12 July 2021. Allergy. – 2021. – V. 76, Issue S110. - P. 176. DOI: 10.1111/all.15095
2. Изучение взаимодействия фуллерена C60 с арилуглеводородным рецептором [Электронный ресурс] / Д.К. Болякина, **А.А. Галкина**, С.М. Андреев, [и др.] // Вестник аллерголога-иммунолога. – 2021. – Режим доступа: <https://allergovestnik.ru/study-of-the-fullerene-c60-interaction-with-aryl-hydrocarbon-receptor/>. (Дата обращения: 11.03.2025) (на английском языке)
3. Синтез и сравнительная оценка антимикробной активности катионных пептидов [Электронный ресурс] / **А.А. Галкина**, Д.К. Болякина, А.Б. Третьякова, [и др.] // Вестник аллерголога-иммунолога. – 2022. – Режим доступа: <https://allergovestnik.ru/sintez-i-sravnitelnaya-ocenka-antimikrobnj-aktivnosti-kationnyh-peptidov/>. (Дата обращения: 11.03.2025)
4. Анализ взаимодействия фуллерена C60 с арил-углеводородным рецептором в качестве возможной биологической мишени [Электронный ресурс] / Д.К. Болякина, **А.А. Галкина**, С.М. Андреев, [и др.] // Вестник аллерголога-иммунолога. – 2022. – Режим доступа: <https://allergovestnik.ru/analiz-vzaimodejstviya-fullerena-c60-s-aril-uglevodorodnym-receptorom-v-kachestve-vozmozhnoj-biologicheskoy-misheni/>. (Дата обращения: 11.03.2025)
5. Получение нового полиаргининового дендримерного пептида и исследование его противомикробной и трансфекционной активности [Электронный ресурс] / М.О. Бабихина, А.А. Шатилов, А.В. Шатилова, А.М. Хохлова, Л.В. Сапрыгина, **А.А. Галкина**, Е.А. Турецкий, С.М. Андреев, В.В. Смирнов, М.Р. Хайтов // Вестник аллерголога-иммунолога. – 2022. – Режим

доступа: <https://allergovestnik.ru/poluchenie-novogo-poliargininovogo-dendrimernogo-peptida-i-issledovanie-ego-protivomikrobnoj-i-transfektionnoj-aktivnosti/>. (Дата обращения: 11.03.2025)

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на:

1. Международный гибридный конгресс Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСИ) (Краков, Польша, и Мадрид, Испания, 10-12 июля 2021 г.).

2. Международный конгресс по молекулярной иммунологии и аллергологии ИМАС-21 (Москва, Российская Федерация, 2-3 декабря 2021 г.) и ИМАС-22 (Москва, Российская Федерация, 1-2 декабря 2022 г.).

3. Школа по аллергологии и иммунологии им. академика Р.М. Хаитова (Москва, Российская Федерация, 21-22 февраля 2024 г.).

4. IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биотехнология: надежды и свершения» (Москва, Российская Федерация, 3 июня 2025 г.).

5. 21-й Международный междисциплинарный конгресс по аллергологии и иммунологии (Москва, Российская Федерация, 6-7 июня, 2025 г.).

Секция Ученого совета отмечает, что в результате выполненных соискателем исследований:

- разработана научная идея о синергизме фуллерена C₆₀ и катионных пептидов в составе комбинированных соединений в подавлении воспаления, связанного с бактериальной инфекцией;

- предложена оригинальная научная гипотеза о способности комбинированных соединений фуллерена C₆₀ поддерживать функциональную активность клеток иммунной системы, вырабатывающих IFN- γ , и ингибировать развитие сепсис-ассоциированной иммуносупрессии;

- доказана перспективность селективного воздействия комбинированных соединений фуллерена C₆₀ на различные компоненты IL-1-опосредованного каскада, включая регуляцию экспрессии генов *Il1a*, *Il1b*, *Il1rn* и их рецепторного аппарата, для разработки новых стратегий терапии локальных и генерализованных воспалительных процессов;

- введены принципы и численные критерии оценки биологической активности, эффективности и безопасности комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и катионных пептидов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

- доказана эффективность методики тестирования комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и катионных пептидов *in vivo* при моделировании воспалительного процесса для оценки их биологической активности;

- применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования, в том числе полимеразная цепная реакция в реальном времени, моделирование *in vivo* состояния эндотоксического шока и раневого поражения кожи, методы культивирования и стимуляции бактериальных и эукариотических клеток и др.;

- изложены экспериментальные доказательства безопасности комбинированных соединений фуллерена C₆₀ и катионных пептидов для клеток млекопитающих в определенном диапазоне концентраций;

- раскрыта целесообразность использования соотношений уровней экспрессии генов *Il1rn/Il1b* и *Il10/Tnfa* на раннем этапе развития системной воспалительной реакции как предикторов выживаемости при тяжелом течении сепсиса;

- изучена зависимость между снижением экспрессии генов факторов ангиогенеза и восстановлением кислородного баланса в микроокружении

раны в присутствии комбинированных соединений фуллерена C60 с катионными пептидами;

- проведена модернизация экспериментальных подходов к изучению регуляции воспаления при раневом поражении кожи у мышей: расширен спектр факторов, участвующих в регенерации тканей, которые могут служить маркерами для оценки интенсивности процессов заживления ран.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- разработаны и внедрены в практику модели летального и нелетального эндотоксического шока на мышцах, которые необходимы для тестирования новых средств терапии данной патологии;

- определены перспективы использования линейных и дендримерных катионных пептидов для получения ковалентных и нековалентных комбинированных соединений с фуллереном C60, которые обладают мультибиологической активностью;

- создан набор из 3 комбинированных соединений фуллерена C60 и оригинальных катионных пептидов с выраженной антибактериальной активностью в отношении условно-патогенных видов бактерий, в том числе штаммов с множественной лекарственной устойчивостью: *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae* и *A. baumannii*;

- представлены рекомендации по использованию результатов исследования в разработке полифункциональных препаратов на основе фуллерена C60 и антимикробных пептидов и оценке их биологической активности.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- все результаты получены на сертифицированном и откалиброванном оборудовании с использованием апробированных коммерческих реактивов и наборов реагентов, показана воспроизводимость результатов исследования в различных условиях;

- теория построена на известных, проверяемых фактах и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации, общепринятыми представлениями о системном воспалительном ответе при развитии эндотоксического шока и раневом воспалении кожного покрова;

- идея базируется на обобщении передового опыта автора и других исследователей по рассматриваемой тематике, как отечественных, так и зарубежных исследований в области изучения биологической активности фуллерена C₆₀ и его производных;

- использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике, отечественных и зарубежных исследований;

- установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике;

- использованы современные методы сбора и обработки исходной информации, а также статистические методы исследования.

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

Соответствие диссертации предъявляемым требованиям и рекомендации к защите

Диссертация 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» охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием соответствующего методологически обоснованного плана научного исследования, основной идейной линии, концептуальностью и взаимосвязью выводов.

Диссертационная работа изложена на 271 странице машинописного текста и содержит 87 рисунков и 22 таблицы. Диссертация оформлена в традиционном стиле и включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Библиография включает 308 источников, в том числе 20 отечественных и 288 зарубежных.

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

Исходя из вышеизложенного, постановили:

Диссертация 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 актуальных научных задач, имеющих важное значение для иммунологии: получены

комбинированные соединения фуллерена C60 и оригинальных катионных пептидов, обладающие одновременно противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью в отношении патогенных штаммов бактерий, в том числе, с множественной лекарственной устойчивостью; получены данные о влиянии комбинированных соединений фуллерена C60 и оригинальных катионных пептидов на иммунопатогенез системной воспалительной реакции: доказана способность комбинированных соединений подавлять экспрессию гена *Il1b* и стимулировать экспрессию гена *Il1rn in vivo* на модели LPS-индуцированного шока, предотвращая гибель животных; показана способность комбинированных соединений фуллерена C60 подавлять экспрессию генов провоспалительных цитокинов, стимулировать экспрессию генов, отвечающих за заживление тканей без рубцов, и ускорять процесс ангиогенеза и восстановления баланса кислорода в микроокружении раны; доказана перспективность применения комбинированных соединений фуллерена C60 и катионных пептидов для терапии воспаления ран и заболеваний, осложненных бактериальной инфекцией. 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) и может быть представлена к защите в диссертационном совете.

Заключение принято на заседании секции №1 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России 28 апреля 2025 года. Присутствовало на заседании 12 членов секции, в том числе 7 докторов наук и 5 кандидатов наук по специальности «3.2.7. Иммунология». Результаты голосования: «за» 12 человек, «против» – 0 человек, «воздержалось» – 0 человек, протокол №2 от 28 апреля 2025 года.

Председатель секции №1 Ученого совета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, к.м.н.



А.И. Мартынов

Секретарь секции, к.м.н.



Е.Ю. Малкина

Подпись *Мартынов А.И., Малкина Е.Ю.*
ЗАВЕРЯЮ
Учёный секретарь ФГБУ
"ГНЦ Институт иммунологии"
ФМБА России
Власов А.А.
"12" *мая* 20*25* г.

