

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Е.Б. Меньшиковой на диссертационную работу Е.А. Пашкиной "Иммуномодулирующие свойства комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология

Одной из важных проблем современной клинической иммунологии является создание препаратов, способных усиливать иммунную защиту, при этом не приводя к нежелательным последствиям. В разных сферах фармакологии, в том числе иммунофармакологии, предпринимается множество усилий и ухищрений для создания пролонгированных форм препаратов, обладающих специфичностью эффекта и воздействующих на целевые мишени (клетки); с целью защиты от преждевременной деградации и создания стационарной концентрации соединения, в том числе белковой природы, заключают в липосомы, ниосомы, аквасомы, адсорбируют на различные носители, модифицируют с помощью полимеров, формируют супрамолекулярные комплексы по типу "гость – хозяин". В этой связи актуальность настоящей диссертационной работы не вызывает сомнений, поскольку предметом ее исследования послужил натуральный иммуномодулятор тетрапептид тафтсин, заключенный в молекулярный контейнер – макроциклический кавитанд кукурбит[7]урил.

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка 185 источников использованной литературы. Содержание диссертации изложено на 116 страницах, включая 7 таблиц и 6 иллюстраций.

Во введении дано обоснование актуальности проблемы и поставлена цель работы: изучить свойства комплекса кукурбит[7]урила с иммуномодулирующим пептидом тафтсином в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Задачи исследования адекватны поставленной цели и четко сформулированы. Положения, выносимые на защиту, в последующем последовательно доказываются полученными автором результатами и их трактовкой.

Обзор литературы, изложенный на 34 страницах, отражает современные представления о биологически активных пептидах и лекарственных средствах на их основе, применяемых в иммунологии, в том числе о проблемах их использования. Автором подробно, всесторонне и последовательно изложены имеющиеся в литературе сведения о возможностях решения этих проблем: описаны альтернативные

внутривенному способу введения пептидных препаратов, указаны способы их стабилизации путем использования различных систем доставки. Отдельный раздел данного фрагмента работы посвящен характеристике свойств кукурбитурилов, описанию их комплексов по типу «гость-хозяин» с различными лекарственными средствами, в том числе и возможности образования комплексов с препаратами на основе пептидов. Обзор литературы оставляет хорошее впечатление, хотя использованные в нем источники не всегда достаточно современны; кроме того, для облегчения восприятия материала целесообразно было бы привести рисунок, иллюстрирующий комплексообразование пептидов с макроциклическими кавитандами.

В главе "Материалы и методы" дано обоснование методики постановки экспериментов, описаны способы оценки константы комплексообразования кукурбит[7]урилы с тафтсином, выделения моноклеаров из крови и их культивирования, определения пролиферативной активности, клеточного цикла, апоптоза и продукции цитокинов, получения клеток перитонеального экссудата у лабораторных животных, их культивирования и определения продукции супероксид-аниона и Fc-рецептор-опосредованного фагоцитоза, а также традиционные методы, позволяющие оценить влияние тестируемого вещества на показатели гуморального и клеточного иммунитета *in vivo* (оценка количества антителообразующих клеток в селезенке и интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа). В работе использованы современные и адекватные поставленным задачам иммунологические методы, конкурентное флуоресцентное титрование, иммуноферментный анализ, проточная цитофлуориметрия, спектрофотометрия, методы статистического анализа; в последнем случае в качестве замечания следует упомянуть, что в случае множественного сравнения неравных выборок уместнее пользоваться непараметрическим критерием Данна, нежели Манна – Уитни.

Степень обоснованности научных положений, выводов и заключений диссертации высокая, работа выполнена на достаточном экспериментальном материале, основные положения и выводы убедительно аргументированы и подтверждены адекватными методическими подходами.

Новизна исследования, а также его научно-практическая значимость несомненны. В результате проведенного комплексного сравнительного исследования Е.А. Пашкина не только впервые добилась получения комплекса кукурбит[7]урилы с тафтсином и определила константу этого процесса, но и всесторонне исследовала способность результирующего супрамолекулярного комплекса влиять на функционирование иммунокомпетентных клеток *in vitro* и *in vivo*, сравнив эффекты с действием отдельных его компонентов. С использованием первичной культуры моноклеаров крови человека

автором установлено, что по сравнению со свободным пептидом, активирующим спонтанную и стимулированную конканавалином А продукцию ФНО α , комплекс повышает уровень спонтанной продукции ФНО α , ИЛ-2, ИНФ- γ и ИЛ-10, а при преактивации клеток конканавалином А увеличивает генерацию ФНО α и ИЛ-2, но угнетает продукцию ИНФ- γ и ИЛ-10. В экспериментах на животных впервые показано, что комплексообразование тафтсина с кукурбит[7]урилом не снижает способность пептида привлекать в брюшную полость клетки – эффекторы воспаления нейтрофилы и макрофаги и стимулировать продукцию ими O_2^- , а при длительном культивировании более существенно увеличивает их фагоцитарную активность, что вкупе с данными об ингибировании КонА-стимулированной продукции ИЛ-10 свидетельствует о возможном потенцировании комплексом воспалительной реакции. Также новыми и интересными являются полученные автором данные о способности комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом усиливать реакции гуморального иммунитета по сравнению со свободным пептидом, повышая количество антителообразующих клеток в селезенке мышей, при этом не влияя на интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа.

В целом Е.А. Пашкина достаточно тщательно и добросовестно описывает достаточно сложную, иногда противоречивую картину влияния сложного супрамолекулярного комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом – потенциального иммуномодулятора. В целом работа оставляет приятное ощущение цельности и логичности. Она довольно камерная, но решает ряд насущных задач и позволяет составить впечатление об авторе как достаточно квалифицированном научном сотруднике, способном к самостоятельной теоретической и экспериментальной работе.

Диссертационная работа в достаточной степени иллюстрирована рисунками и таблицами. Выводы вытекают из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам, сформулированы ясно и убедительно, хотя картину несколько портят досадные опечатки и несогласования в итоговом выводе 7. Обсуждение написано очень хорошо, не грешит повторением изложения результатов, как это часто бывает.

Автореферат отражает содержание диссертации. Результаты работы неоднократно докладывались на научных конференциях и симпозиумах и изложены в 10 публикациях, в том числе в 4 статьях в рецензируемых журналах, 2 из которых входят в перечень научных изданий ВАК при Минобрнауки РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Помимо упомянутых выше замечаний, которые носят дискуссионный и рекомендательный характер и не влияют на общую положительную оценку работы, хотелось бы задать два вопроса.

1. Чем обусловлен выбор именно данного кавитанда, с 7 гликольурильными фрагментами?

2. Почему при исследовании фаз клеточного цикла и апоптоза не проведены эксперименты с тафтсином и его комплексом с кукурбитурилом, а только со свободным кавитандом?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, диссертационная работа Пашкиной Е.А. "Иммуномодулирующие свойства комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом" представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития клинической иммунологии. Диссертация надлежащим образом оформлена, отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Пашкина Е.А., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология и аллергология.

Руководитель лаборатории
молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов
Федерального государственного научного бюджетного учреждения
"Научно-исследовательский институт
экспериментальной и клинической медицины,
доктор медицинских наук  Е.Б. Меньщикова

Адрес: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2;
тел. +7-913-764-3387, электронная почта lemen@centercem.ru

