

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Толстиковой Татьяны Генриховны  
адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 9. Тел/факс: 8(383)3300731,  
e-mail: [tg\\_tolstikova@mail.ru](mailto:tg_tolstikova@mail.ru) заведующей лабораторией фармакологических исследований  
ФГБУН Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН  
на диссертацию **Пашкиной Екатерины Александровны**  
*«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»

В настоящее время в мировой фармации одним из самых предпочтительным направлением для разработки лекарственных препаратов является направление «Drug Delivery». Длительность и стоимость таких исследований, как правило, в несколько раз короче и дешевле традиционного пути создания лекарственных препаратов и позволяет улучшить токсико-фармакологические свойства, защитить от биodeградации, а также получить более удобные в применении альтернативные лекформы уже использующихся в медицинской практике лекарственных средств.

В этой связи, диссертационная работа Пашкиной Екатерины Александровны посвящена актуальной проблеме - разработке способа получения комплексов иммуномодулятора тафтсина с супрамолекулярными соединениями кукурбитурилами по принципу «гость-хозяин» и изучению базовых свойств в новой форме.

Структура диссертация Пашкиной Е.А. построена по общепринятому плану, изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 6 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель включает 185 литературных источников, из них 38 отечественных и 147 зарубежных.

В общей характеристике работы автор четко и лаконично определяет актуальность проблемы, формулирует цели и задачи исследования, обосновывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

Глава первая посвящена анализу отечественной и зарубежной научной литературы по теме диссертации. В частности, в литературном обзоре освещены история исследования, применения, свойств пептидных препаратов, приводятся лекарственные средства на основе пептидов, применяемых в настоящее время в иммунологии. Отражены все негативные факторы, которые могут возникать при применении белковых либо пептидных препаратов. Вторая проблема, которой посвящен обзор – пути и методы защиты от биodeградации пептидных препаратов. Основываясь в основном на иностранные источники, автор приводит примеры путей стабилизации пептидных препаратов с использованием различных систем доставки лекарственных средств.



Перспективным направлением в разработке систем доставки пептидных и белковых препаратов является образование комплексов «гость-хозяин», которые могут быть получены с такими супрамолекулярными соединениями, как циклодекстрины, каликсарены, кукурбитурилы, кроун-эфиры, криптофаны и др. Дана подробная характеристика кукурбитурилу, как наиболее перспективному комплексообразующему веществу, приведены примеры комплексов кукурбитурилов по типу «гость-хозяин» с парацетамолом, мемантином, цисплатином, прилокаином, кумарином, изониазидом и другими лекарственными средствами.

Во второй главе основательно рассмотрены объекты исследования, описаны подробно используемые методы для решения экспериментальных задач - это конкурентное флуоресцентное титрование для получения комплексов; методы для исследований *in vitro* (выделение моноклеарных клеток из периферической крови человека, оценка пролиферативной активности клеток, показателей клеточного цикла, определение продукции цитокинов МНК ПК и др.), *in vivo* для определения иммуномодулирующей активности комплексов на гуморальном и клеточном уровне.

Для статистической обработки результатов автор вычислял медиану (Me), 25-ю и 75-ю процентиль (LQ, HQ), и представлял в виде Me (LQ, HQ). Оценку различий между клетками, культивированными в различных условиях, проводил при помощи непараметрического критерия Вилкоксона, а различия между группами животных оценивал с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни, достоверными считали результаты при  $p < 0,05$ .

Третья глава диссертации посвящена результатам собственных исследований.

Данную работу можно разделить на два этапа. Первый этап – это разработка методов и подбор физико-химических условий для синтеза стабильных комплексов кукурбит[7]урилов с иммуномодулирующим трипептидом тафтсином.

Второй этап работы – это проведение биоиспытания комплекса в сравнении с отдельными компонентами. В экспериментах *in vitro*, автором показано, что комплекс тафтсина с кукурбит[7]урилом не влияет на пролиферативную активность моноклеарных клеток из периферической крови здоровых доноров при спонтанной пролиферации и в случае стимулирования митогеном конканавалином А. Свободный трипептид и кукурбит[7]урил в отдельности также не влияют на пролиферацию моноклеаров, как в случае спонтанной пролиферативной активности, так и при стимулировании митогеном. При воздействии на уровень цитокинов показано, что комплекс кукурбит[7]урила с тафтсином повышал уровень спонтанной продукции всех исследуемых цитокинов, в то время как свободный пептид активировал продукцию только ФНО- $\alpha$ . При стимуляции клеток конканавалином А комплекс воздействовал на все цитокины не однозначно - повышал уровень ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2 и снижал уровень ИНФ- $\gamma$  и ИЛ-10. Свободный пептид повышал уровень стимулированной продукции только ФНО- $\alpha$ .

Впервые изучено влияние комплекса кукурбит[7]урила с тафтсином на способность клеток продуцировать супероксидный радикал, в частности,



комплексообразование не изменяет способности пептида стимулировать продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами, как *in vitro*, так и *in vivo*. Кукурбит[7]урил не влияет на способность нейтрофилов и перитонеальных макрофагов продуцировать супероксидный радикал. Кроме того, показано, что при коротком сроке культивации комплекс тафтсина с кукурбит[7]урилом обладает аналогичным свободному тафтсину действием на фагоцитоз перитонеальных макрофагов, при увеличении же срока культивирования - более существенно, чем свободный пептид увеличивает фагоцитарную активность.

Впервые продемонстрировано, что комплексообразование с кукурбит[7]урилом не изменяет способность тафтсина повышать интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа. Комплекс кукурбит[7]урила с тафтсином способен статистически значимо усиливать реакции гуморального иммунитета, повышая количество антителообразующих клеток в селезенке у лабораторных животных, по сравнению со свободным пептидом.

В четвертой главе автор обосновывает, обсуждает и обобщает результаты, полученные в ходе проведения экспериментов.

Данная работа имеет большую теоретическую и практическую значимость для экспериментальной и клинической иммунологии, фармакологии и фармации. Предлагаемый подход по модификации пептида тафтсина посредством комплексования с кукурбит[7] урилом с целью защиты от биodeградации может быть использован для создания новой лекарственной формы препарата для клинического применения. Кроме того, разработанный подход может быть использован и для других пептидов, содержащих положительно заряженные аминокислотные остатки.

По результатам исследований опубликовано 10 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата наук.

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается более, чем достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Автореферат и опубликованные работы отражают основные положения и выводы представленной диссертации. Принципиальных замечаний по диссертационной работе Пашкиной Екатерины Александровны нет.

В порядке дискуссии хотелось задать несколько вопросов:

1. По каким критериям автор судил о полной защите от биodeградации трипептида?
2. Перечислите, пожалуйста, более четко, преимущества комплексообразования в отношении базовых свойств трипептида?
3. Какие, зарегистрированные в России в виде комплексов «гость-хозяин» иммунопрепараты уже применяются?



## Заключение

Диссертационная работа Пашкиной Екатерины Александровны «Иммуномодулирующие свойства комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом», является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи – создание новой лекарственной формы в виде комплекса по типу «гость-хозяин» для трипептида иммуномодулятора тафтсина с кукурбит[7]урилом, позволяющей защитить от быстрой биодеградации в физиологической среде и сохранить высокую базовую иммуномодулирующую активность пептида.

По объему, актуальности, научной новизне, методическому уровню, достоверности полученных материалов и однозначности выводов, научной и практической значимости работа Пашкиной Екатерины Александровны соответствует требованиям ВАК п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 и вступившего в силу 1 января 2014 г, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – «клиническая иммунология и аллергология».

Официальный оппонент, заведующая  
лабораторией фармакологических исследований  
Отдела медицинской химии  
ФГБУН Новосибирского института органической  
химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,  
доктор биологических наук, профессор



Т.Г. Толстикова

Подпись Т.Г. Толстиковой удостоверяю  
Ученый секретарь ФГБУН  
Новосибирского института органической  
химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,  
кандидат химических наук, с.н.с.



И.А. Халфина