

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 001.001.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ» ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 28 апреля 2016 года № 240

О присуждении Пашкиной Екатерине Александровне, гражданке РФ,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Иммуномодулирующие свойства комплекса тафтсина с
кукурбит[7]урилом» по специальности 14.03.09 – «Клиническая
иммунология, аллергология» принята к защите 16 февраля 2016 года,
протокол № 237 диссертационным советом Д001.001.01 на базе
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-
исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»
(НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа
Минобрнауки России № 714 от 02.11.2012 года.

Соискатель Пашкина Екатерина Александровна, 1985 года рождения.

В 2009 году соискатель окончила Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский
государственный университет» (в настоящее время Федеральное
государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет»).

В 2012 году окончила очное обучение в аспирантуре Федерального
государственного бюджетного научного учреждения «Научно-

исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология, работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ.

Диссертация выполнена в лаборатории клинической иммунопатологии отдела клинической иммунологии НИИФКИ.

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Козлов Владимир Александрович, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии».

Официальные оппоненты:

1. **Меньщикова Елена Брониславовна**, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», руководитель лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов;

2. **Толстикова Татьяна Генриховна**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова», руководитель лаборатории фармакологических исследований, дали положительные отзывы о диссертации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», г. Томск

В своем положительном заключении, подписанном Шерстобоевым Евгением Юрьевичем, доктором медицинских наук, профессором, заведующим отделом иммунофармакологии, заместителем директора по экспертизе доклинических исследований, указано, что в работе на основании полученных автором данных осуществлено решение актуальной задачи – изучены иммуномодулирующие свойства супрамолекулярного комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Изучение влияния комплексообразования на биологические свойства препаратов позволяет расширить представления о современных системах лекарственной доставки, используемых с целью защиты от биodeградации. По актуальности темы, объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Пашкиной Е.А. полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает искомой степени кандидата биологических наук.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, из них по теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 2 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Щепотина Е.Г., Пашкина Е.А., Якушенко Е.В., Козлов В.А. Кукурбитурилы - контейнеры для лекарственных соединений // «Российские нанотехнологии» - 2011. – Т. 6. - N 11-12. – С. 97-101 .
2. Пашкина Е.А., Щепотина Е.Г., Гришина Л.В., Канажевская Л.Ю., Герасько О.А., Козлов В.А. Иммуноактивные свойства тафтсина при комплексообразовании его с кукурбит[7]урилом // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. - № 2/2 (35). – С. 50-51.

3. Пашкина Е. А., Гришина Л. В., Любимов Г. Ю., Козлов В. А. Влияние комплекса тафтсина с кукурбит[7]урилом на гуморальный и клеточный иммунный ответ *in vivo*// Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8(17), № 3. – С. 367-369.
4. Пашкина Е. А., Любимов Г. Ю., Гришина Л. В., Герасько О.А., Якушенко Е.В., Козлов В. А. Влияние комплекса пептида тафтсина с кукурбит[7]урилом на продукцию супероксидного радикала *in vitro* и *in vivo* // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – Т.35, №1. – С. 14-18.

Все основные результаты, представленные на защиту, опубликованы в оригинальных статьях в рецензируемых изданиях и тезисах докладов в сборниках научных конференций. Основные экспериментальные и клинические результаты, их статистическая обработка и представление в виде публикаций выполнены соискателем лично.

На диссертацию и автореферат поступило 4 отзыва от:

1. Ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», д.б.н. Зенкова Николая Константиновича.
2. Вр.и.о. директора, заведующего лабораторией механизмов межклеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии», д.б.н. Усынина Ивана Федоровича.
3. Заведующей Центральной научно-исследовательской лабораторией Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Дальневосточный государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н. Флейшман Марины Юрьевны.

4. Научного сотрудника лаборатории химии РНК Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, к.х.н. Апарцина Евгения Константиновича.

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, указывается, что результаты работы демонстрируют потенциальные возможности для разработки новых лекарственных форм с целью защиты от биodeградации, а также модификации свойств уже готовых лекарственных препаратов, в том числе и иммуномодулирующих пептидов. Отмечается, что принципиальным результатом, полученным в работе, является выявление новых данных о влиянии комплекса на цитокинпродуцирующую способность моноклеарных клеток периферической крови (МНК ПК), при этом установлено, что, по сравнению со свободным пептидом, активирующим продукцию только ФНО α , комплекс повышал уровень спонтанной продукции ФНО- α , ИЛ-2, ИНФ- γ и ИЛ-10, а в случае КонА-стимулированной продукции повышал уровень ФНО- α и ИЛ-2 и снижал уровень ИНФ- γ и ИЛ-10; кроме того, комплекс кукурбит[7]урилы с тафтсином способен статистически значимо усиливать реакции гуморального иммунитета, повышая количество антителообразующих клеток в селезенке у лабораторных животных, по сравнению со свободным пептидом. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержат.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» является одним из ведущих научно-медицинских биотехнологических центров России, осуществляющим комплексное

решение фундаментальных и прикладных проблем современной медицинской фармакологии, имеющих принципиальное значение для развития теоретической биомедицинской науки и для решения актуальных задач здравоохранения. Одним из основных направлений института является проведение исследований по созданию новых лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения, в том числе на основе геномных, постгеномных технологий и нанотехнологий. Проводятся исследования новых оригинальных препаратов – антигипоксантов, антиметастатиков, препаратов, улучшающих реологические свойства крови, иммуномодуляторов, препаратов для лечения анемий и лейкопений различного генеза, препаратов для регенеративной медицины, нарушений половой функции и ряда других распространенных заболеваний. Указанное направление отражено в многочисленных публикациях сотрудников учреждения.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук Е.Б. Меньшиковой обосновывается тем, что она имеет опыт участия в большом количестве исследований, посвященных изучению продукции активных форм кислорода и азота, механизмов редокс-регуляции воспалительных процессов, а также молекулярных механизмов процесса эндоцитоза, что отражено в отечественных и зарубежных публикациях.

Выбор официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Т.Г. Толстиковой обосновывается ее широкой известностью благодаря достижениям в экспериментальных исследованиях на моделях *in vivo* и *in vitro* фармакологических свойств более 1000 новых соединений, в результате чего были выявлены перспективные для медицины лекарственные препараты.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Показано, что тетрапептид тафтсин образует комплекс по типу «гость-хозяин» с СВ[7]; константа связывания, характеризующая стабильность комплекса, составляет $(2.1 \pm 0.4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Доказано, что СВ[7] в концентрации 0,5 мМ обладает иммуномодулирующим действием, повышая спонтанную продукцию ИНФ γ МНК ПК и модулируя КонА-индуцированную продукцию цитокинов, ИНФ γ , ИЛ-10 и ИЛ-2, а также стимулирует Fc-опосредованный фагоцитоз перитонеальными макрофагами мыши.

Доказано, что комплексообразование тафтсина с СВ[7] расширяет спектр воздействия на цитокинпродуцирующую способность МНК ПК, усиливает стимулирующее влияние на фагоцитоз при длительном сроке культивирования и повышает продукцию антител *in vivo*.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Изучен новый вклад в исследование защиты пептидных и белковых препаратов от биodeградации, основанной на образовании комплексов типа «гость-хозяин» с супрамолекулярными соединениями.

Применительно к проблематике диссертации

Результативно использован комплекс существующих современных экспериментальных методик, включающий конкурентное флуоресцентное титрование, проточную цитофлуориметрию, иммуноферментный анализ.

Показано, что комплексообразование тафтсина с СВ[7] не влияет на способность пептида повышать продукцию супероксидного радикала нейтрофилами и макрофагами как *in vitro*, так и *in vivo*, а также стимулировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа *in vivo*.

Доказано, что комплекс СВ[7] с тафтсином повышает уровень спонтанной продукции ФНО α , ИНФ γ , ИЛ-2 и ИЛ-10, в то время как свободный пептид активирует продукцию только ФНО- α . При стимуляции клеток КонаА свободный пептид повышает уровень стимулированной продукции только ФНО α , не влияя на продукцию остальных цитокинов. Комплекс оказывает действие на продукцию цитокинов, продуцируемых стимулированными КонаА клетками, повышая уровень ФНО α и ИЛ-2 и снижая уровень ИНФ γ и ИЛ-10, что говорит о более широком спектре действия комплекса на цитокинпродуцирующую активность МНК ПК по сравнению со свободным тафтсином.

Показано, что при коротком сроке культивирования тафтсин и его комплекс с СВ[7] обладают схожим стимулирующим действием, одинаково усиливая Fc-опосредованный фагоцитоз перитонеальными макрофагами, в то время как при увеличении срока культивирования комплекс проявляет более выраженный стимулирующий эффект на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, чем свободный пептид.

Показано, что комплекс тафтсина с СВ[7], в отличие от свободного пептида, увеличивает число антителообразующих клеток в селезенке у мышей после внутрибрюшинного введения соединений, что свидетельствует о стимулирующем влиянии комплекса на продукцию антител.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что

Определено, что комплексообразование пептида тафтсина с кукурбит[7]урилом, предлагаемое с целью защиты от биodeградации, может быть использовано для создания препарата для клинического применения. Кроме того, комплексообразование в качестве подхода для модификации лекарственных пептидов может быть использовано и для других пептидов и белков, содержащих положительно заряженные аминокислотные остатки.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: исследование проведено на сертифицированном оборудовании; полученные автором данные сопоставимы с опубликованными в научной литературе данными об иммуномодулирующем действии пептида тафтсина *in vivo* и *in vitro*, а также результатами исследований биологических эффектов кавитанда кукурбитурила. Для математической обработки полученных результатов использованы современные методы сбора и обработки информации. Количество наблюдений достаточное. Выводы соответствуют поставленным задачам и логически вытекают из полученных данных.

Личный вклад соискателя состоит в: непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах. Автором был проведен анализ имеющейся научной информации по теме исследования. Константа комплексообразования была определена методом конкурентного флуоресцентного титрования. Экспериментальная работа с интактными клетками и культурами клеток включала выделение моноклеарных клеток из периферической крови соматически здоровых доноров, культивирование моноклеарных клеток *in vitro* в присутствии и в отсутствие КонА, исследование фенотипических характеристик клеток методом проточной цитофлуориметрии, а также получение перитонеальных макрофагов и нейтрофилов мыши, культивирование элиситированных клеток, оценку Fc-рецептор-опосредованного фагоцитоза, оценку продукции супероксидного радикала перитонеальными нейтрофилами и макрофагами мыши. Оценка показателей гуморального иммунного ответа у лабораторных животных путем определения количества локальных зон гемолиза, клеточного иммунного ответа по степени выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа – проведена лично автором. Определение уровня цитокинов TNF α , ИЛ-2, ИНФ γ и ИЛ-10 методом иммуноферментного анализа выполнено лично автором. Статистическая обработка и интерпретация экспериментальных данных проведена лично автором.

Научные положения и выводы, сделанные в диссертационной работе, обоснованы результатами собственных исследований автора. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

На заседании 28 апреля 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Пашкиной Е.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 9 докторов наук по специальности 14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология» (биологические науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени 19, против присуждения учёной степени 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН



Козлов
Владимир
Александрович

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат медицинских наук

Белогородцев
Сергей Николаевич