

ОТЗЫВ

**Официального оппонента на диссертацию Анастасии Васильевны СМОЛИНОЙ
на тему: «ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ НА
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА», представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.02 – биофизика.**

1. Актуальность выбранной темы

Одной из главных причин тяжелой инвалидизации пожилых людей является деменция, обусловленная болезнью Альцгеймера. Сегодня в экономически развитых странах исследования в области болезни Альцгеймера стали одним из приоритетных направлений в развитии медицинской науки и здравоохранения. По данным Delphi Consensus study ежегодно в мире регистрируется 4,6 млн новых случаев деменции, т.е. каждые 7 секунд появляется 1 новый случай приобретения слабоумия. Ожидается, что к 2020 г. в мире будет 44,2 млн. людей, страдающих деменцией, а к 2040 г. их численность достигнет уже 81, 1 млн. Популяционно эпидемиологические исследования, проведенные в Центре по изучению болезни Альцгеймера ГУ НИЦПЗ, показали, что в Москве каждый 22 пожилой человек страдает болезнью Альцгеймера. Общий размер средств, необходимых для ухода за дементными больными, быстро возрастает в последние десятилетия, что является следствием увеличения их популяции.

Лечение болезни Альцгеймера является одним из наиболее дорогостоящим и по стоимости только операции на сердце и лечение онкологических больных требуют еще больших материальных затрат. В связи с этим поиск направленных способов профилактики и медикаментозной коррекции патологии имеет важнейшее научно-практическое и социальное значение.

Количество препаратов, способных эффективно влиять на предупреждение развития или лечение болезни Альцгеймера крайне ограничено. В настоящее время выделяются значительные средства из государственных фондов и частных компаний США и Европы для поиска новых эффективных средств, способных улучшить состояние пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера. Однако отечественного препарата, способного уменьшать проявления негативных тенденций при развитии болезни Альцгеймера, до сих пор не создано.

Чтобы понять какой препарат и с какими свойствами будет эффективен для данной патологии, необходимо знать его функции и механизмы действия на различные мишени, участвующие в патогенезе болезни Альцгеймера.

Сказанное позволяет заключить, что **тема диссертационной работы Смолиной Анастасии Васильевны, посвященная исследованию физико-химических механизмов действия водорастворимых производных фуллерена C₆₀ на терапевтические мишени болезни Альцгеймера, является чрезвычайно актуальной.**

Диссертационная работа А. В. Смолиной построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения полученных результатов, их обсуждения, заключения. Работа представлена на 143 страницах и включает 30 рисунков, из них 3- в литературном обзоре, 1- в методической части, 26 иллюстрируют результаты экспериментов. Список цитированной литературы, включает 291 ссылку.

Обзор литературы демонстрирует хорошую эрудицию автора в исследуемом вопросе. Он состоит из пяти основных частей, каждая из которых посвящена различным аспектам современного состояния исследований биологической активности фуллеренов, их нейропротекторного действия и описания нейропатогенеза болезни Альцгеймера с акцентом на терапевтические мишени заболевания, такие как β -амилоидные белки, ионотропные глутаматные AMPA и NMDA рецепторы, моноаминоксидаза В. Также рассматриваются аспекты окислительного стресса, который играет ключевую роль в нейропатогенезе болезни Альцгеймера. Все представленные разделы обзора имеют непосредственное отношение к самой диссертационной работе. Излагаемый материал хорошо систематизирован, содержит необходимые для понимания иллюстрации.

2. Новизна исследований и полученных результатов

Диссертационная работа является логичным и последовательным исследованием, содержащим ряд новых и значимых для науки результатов.

Так, в работе Смолиной А.В. впервые комплексно исследовались две группы водорастворимых производных фуллерена C₆₀: полизамещенные производные фуллерена C₆₀ (ППФ) и гибридные структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ с биологически активными группировками, среди которой особое значение имела гибридная структура, у которой к сфероиду фуллерена был присоединен бензильный аналог димебона- отечественного препарата, обладающего выраженной нейропротекторной активностью. В работе Смолиной А.В. убедительно достоверно

показано, что изученные препараты обладают потенциальной когнитивно-стимулирующей активностью, не проявляя нейротоксичных свойств.

Другие новые и важные результаты, полученные диссертантом, заключаются в демонстрации полифункциональной способности изучаемых производных фуллеренов непосредственно влиять на несколько важных потенциальных мишеней, характерных для нейропатогенеза болезни Альцгеймера. Показано, что полизамещенные производные фуллерена C_{60} (ППФ) и гибридные структуры с его участием способны ингибировать ферментативную активность моноаминоксидазы В, которая участвует в модуляции настроения и эмоций, а также в контроле двигательных, перцептивных и когнитивных функций. Установлено, что препараты являются позитивными модуляторами ионотропных глутаматных AMPA рецепторов ЦНС млекопитающих, которые участвуют в передаче информации большинства нейронов ЦНС, а также в регуляции гомеостаза Ca^{2+} , в обеспечении пластичности нейронов и процессах консолидации памяти. Производные фуллерена препятствуют развитию окислительного стресса. Среди изученных препаратов были выделены наиболее эффективные, которые были протестированы в экспериментах по изучению поведения и когнитивных функций у животных. Было установлено, что изученные препараты улучшают память мышей, повышают исследовательскую активность и не оказывают побочных психостимулирующих эффектов.

Таким образом, установлено, что изученные два типа производных фуллерена проявляют свойства эффективных нейропротекторов, на основе которых могут быть созданы препараты нового поколения для лечения болезни Альцгеймера. Автор диссертации предлагает на основании своих исследований алгоритм оптимизации фармакологических свойств перспективных веществ с участием фуллеренов за счет создания гибридных молекул, в структуру которых включен функционально активный нейропротектор. Такой подход может ускорить создание отечественных препаратов для предупреждения и развития болезни Альцгеймера.

3. Характеристика объектов и методов исследования.

Все результаты диссертации подтверждены экспериментами, проведенными на современном методическом уровне, и их достоверность не вызывает сомнений. В диссертационной работе А. В. Смолиной были использованы производные фуллеренов двух типов, синтезированные в отечественных лабораториях ИПХФ РАН и ИНЭОС РАН. К первой группе относились поликарбоксильные производные фуллерена, у которых к сфероиду фуллерена C_{60} присоединены пять ионогенных карбоксильных групп, а также фуллеренолят калия, в структуре которого присутствовало более двадцати недиссоциирующих гидроксильных полярных групп. Вторая группа препаратов

представляла собой наноструктуры, которые включали в себя сфероид фуллерена C₆₀ и присоединенные к нему функциональные группировки, а также аминокислоту пролин для обеспечения растворимости. Среди этих препаратов особое внимание диссертанта справедливо занимала структура, в которой в качестве биологически активной компоненты входил бензильный аналог димебона. Именно исследование свойств этого препарата позволило автору диссертации предложить схему синтеза препаратов на основе фуллерена, обладающими наиболее эффективными свойствами. Описание препаратов сопровождается графическими изображениями их структуры.

В работе приведены результаты исследования физико-химических и биологических свойств описанных препаратов. Для этого использовались современные биофизические методы исследования, включая метод флуоресцентных зондов для анализа взаимодействия ППФ с модельной фосфолипидной мембраной, метода хемилюминесценции по изменению люминесценции люминола для определения антирадикальной активности препаратов. В работе были использованы также биохимические методы для анализа влияния водорастворимых производных фуллерена (ВРПФ) на каталитическую активность моноаминоксидазы. Электрофизиологический метод patch-clamp был применен для определения характера влияния ВРПФ на AMPA рецепторы. Этот метод требует значительных навыков исследователя, связанного с умением изолировать одиночные нейроны Пуркинье из мозжечка крыс и регистрацией трансмембранных токов. В работе был использован радиолигандный метод анализа для исследования влияния производных фуллерена на связывание двух радиоактивных лигандов с NMDA: [3H]МК-801 (дизоцелпин), который связывается со всеми NMDA рецепторами и [3H] ифенпродил, связывающийся с NMDA рецепторами, содержащими NR2B субъединицы. Для этих экспериментов были выделены мембраны из ткани гиппокампа крыс.

Влияние изучаемых производных фуллеренов на изменение поведения и долговременной памяти животных проводилось в тестах «открытое поле» и узнавание новой локализации известного объекта». Оба теста применены адекватно и полученные результаты не вызывают сомнений.

Все перечисленные методы используются в современной научной практике.

4. Основные положения диссертации, которые выносятся на защиту.

Все положения, вынесенные на защиту, обоснованы и достоверны. Они соответствуют поставленным цели и задачам работы.

Положение 1.

Для убедительного доказательства правомочности использования применения производных фуллеренов в качестве нейропротекторов в диссертационной работе А.В. Смолиной проведены многоуровневые эксперименты по их влиянию на общепризнанные мишени болезни Альцгеймера и, прежде всего, на их способность взаимодействовать и проникать через биологические мембраны. На модельных мембранах фосфатидилхолиновых липосом методом флуоресцентных зондов с использованием двух типов зондов, водорастворимого -2,7-дибромпрофлавина и гидрофобного зонда пирена, показано, что ППФ проникают в фосфолипидные мембраны и локализуются как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов, из которых были сформированы модельные мембраны. Выявлены образцы производных фуллеренов (ППФ III), наиболее активно взаимодействующих с фосфолипидами. Эксперимент детально описан и дается четкое объяснение всех полученных данных. Поэтому представленные результаты позволили автору сделать обоснованный вывод о том, что ППФ проникают в фосфолипидные мембраны и локализуются как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов модельных мембран.

Положение 2.

Проведенное диссертантом определение влияния ППФ на каталитическую активность MAO-B и MAO-A дает возможность оценить эффективность действия препаратов на одну из терапевтических мишеней болезни Альцгеймера, поскольку ингибирование MAO является важным критерием отбора потенциальных препаратов для лечения БА.

В работе показано, что не все изученные препараты в одинаковой степени ингибируют изученные изоформы фермента. ППФ I и II являются эффективными ингибиторами MAO-B, а ППФ III не действуют на его каталитическую активность. Более разнообразное действие оказывают препараты на MAO-A. ППФ I ингибирует, ППФ II активизирует, а ППФ III практически не влияет на активность фермента. Полученный результат позволил автору диссертации сделать заключение, что ППФ I может оказывать антидепрессивный эффект, а ППФ II, возможно, способен снимать повышенное возбуждение нервной системы. Анализируя литературные данные о способности ППФ I и II проявлять высокую антиамилоидную активность и собственные результаты о влиянии этих препаратов на активность MAO-B, автор диссертации приходит к заключению о необходимости дальнейшего изучения молекулярных механизмов действия этих веществ на терапевтические мишени и обращает внимание на перспективные возможности применения производных фуллерена такого типа в клинике для лечения болезни Альцгеймера.

По той же схеме анализировалась способность гибридных структур фуллерена C₆₀ (ГСФ), содержащих в своем составе одну или две нитратные группировки, изменять активность MAO-B и MAO-A. Показано, что ГСФ с двумя нитратными группировками является позитивным модулятором глутаматных AMPA рецепторов и не проявляет нейротоксичных свойств, поскольку не стимулируют ионотропные глутаматные рецепторы ЦНС млекопитающих. Вполне можно согласиться с выводом автора диссертации, что именно эта гибридная структура имеет потенциальные нейропротекторные свойства.

Положение 3.

В полученных диссертантом экспериментах методом хемиллюминесценции, достоверно установлено, что ППФ и ГСФ обладают антирадикальной активностью которая определяется акцепторными свойствами фуллеренового сфероида. Этот факт подчеркивает имеющиеся в литературе сведения об антирадикальных свойствах фуллеренов.

Положение 4.

Учитывая тот факт, что AMPA и NMDA рецепторы – главные мишени при отборе потенциальных препаратов для терапии БА, автор диссертации изучила влияние ППФ и ГСФ на функциональное состояние AMPA рецепторов нейронов Пуркинье мозжечка крыс электрофизиологическим методом patch-clamp, регистрируя амплитуду каинат-вызванных токов AMPA рецепторов. Убедительно было показано, что препараты ППФ I и II вызывают позитивную модуляцию AMPA рецепторов, в то время как ППФ III таким свойством не обладает. Методом радиолигандного связывания было продемонстрировано, что ППФ I-III не влияют на функцию NMDA рецепторов, что указывает на отсутствие нейротоксичности у этих препаратов. Среди изученных ГСФ, которые представляли собой нитраты аминокислотных производных фуллерена, лишь ГСФ VI, в структуре которого содержатся две нитратные группировки, вызывает позитивную модуляцию ответов AMPA рецепторов. Именно это соединение не оказывает влияние на функциональное состояние NMDA рецепторов. Таким образом, положение о том, что изученные водорастворимые производные фуллерена C₆₀ и гибридные структуры являются позитивными модуляторами ионотропных глутаматных AMPA рецепторов и не проявляют нейротоксичности, не активируя ионотропные NMDA рецепторы ЦНС, полностью доказано. В связи с этим автор диссертации справедливо подчеркивает, что именно этот препарат соответствует критериям отбора ингибиторов нейродегенеративных процессов и может быть использован для создания на его основе эффективных препаратов для терапии БА.

Положение 5

Чрезвычайно важными являются эксперименты по изучению влияния производных фуллеренов на поведение животных, подтверждающие полученные выводы при исследовании их действия на молекулярные мишени БА. Установлено, что лидирующие соединения, т.е. наиболее эффективные в модельных экспериментах, способны оказывать положительное влияние на когнитивные функции животных. Полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать ВПРФ-лидеры для предклинического исследования в качестве лекарственных препаратов для лечения БА.

Положение 6.

Наибольшая практическая значимость работы заключена в разделе, посвященном изучению свойств гибридной наноструктуры на основе фуллерена C_{60} , которая содержит два адденда: биологически активное соединение – аналог димебона и натриевую соль пролина. Аналог димебона, используемый для создания такой гибридной молекулы, исходно обладал набором свойств, характеризующих его когнитивно-стимулирующую активность. Однако в поведенческих тестах он проявлял психостимулирующий эффект. Включение этого соединения в гибридную структуру снимало негативные эффекты и сохраняло весь спектр свойств, необходимых для проявления нейропротекторного действия. Результаты экспериментов демонстрируют, что гибридное соединение обладает антиоксидантным действием, ингибирует каталитическую активность MAO-B и активирует MAO-A, является позитивным модулятором AMPA рецепторов и не активирует психомоторное возбуждение. Т.е. получено соединение, сохраняя позитивные свойства исходного нейропротектора, снимает его негативный эффект. В поведенческих экспериментах показано, что полученное нейротропное соединение действительно сохранило когнитивно-стимулирующую активность и лишилось побочного психостимулирующего эффекта. Таким образом доказано, что одним из перспективных способов оптимизации фармакологических свойств когитивно-стимулирующих соединений является направленное конструирование гибридной структуры на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} и фармакологически активных соединений.

5. Научно-практический интерес полученных результатов. Значительный научный интерес представляет исследование биофизическими, биохимическими и физиологическими методами влияния нового класса соединений- водорастворимых производных фуллерена C_{60} и гибридных молекул на основе аминокислотных производных фуллерена C_{60} и присоединенным к ним физиологически активных соединений на биологические мишени болезни Альцгеймера, которые открывают возможность создания потенциальных нейропротекторов, эффективных при лечении

этого заболевания. Важным научным достижением является предложенный в работе путь оптимизации свойств перспективных когнитивно-стимулирующих веществ за счет создания гибридных структур на основе аминокислотных производных фуллеренов C₆₀ и присоединенных физиологически активных соединений. В работе это четко демонстрируется на примере аналога димебона, обладающего нейропротекторными свойствами. Материалы диссертационной работы А.В. Смолиной могут быть использованы в фармакологии при разработке тактики создания отечественных препаратов на основе производных фуллеренов, а также с перспективным применением этих соединений в предклинических и клинических исследованиях. Результаты диссертации целесообразно внедрять в практику исследований в Научном центре психического здоровья, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова, ФГБНУ «Научном центре неврологии» (г. Москва) и др. медицинских центрах. Полученные автором результаты также могут быть использованы при прочтении лекционных курсов для студентов биологических специальностей

6. Недостатки по содержанию и оформлению работы.

Работа лишена недостатков по содержанию. Однако во введении описание основных положений, которые вынесены на защиту, осуществлено достаточно скромно, несмотря на то, что они в самом тексте диссертации демонстрируются очень детально. Среди недостатков в оформлении работы нужно отметить совместное представление данных по влиянию водорастворимых производных фуллеренов на активность ферментов MAO и антирадикальную и антиокислительную активность. Кроме того, в названии раздела не отражено исследование влияния препаратов на MAO-A. Автор сравнивает влияние мемантина- препарата, широко используемого для лечения болезни Альцгеймера с действием ППФ на активность AMPA рецепторов. В этом случае желательно такое сравнение провести в собственных экспериментах, т.к. их условия могут внести значительные изменения в полученные результаты. На стр. 60 перечисляются терапевтические мишени и процессы БА, с помощью которых изучались нейропротекторные свойства ВРПФ, среди которых упоминается агрегация β -амилоидных фибрилл. Однако эксперименты с этой мишенью в диссертации отсутствуют. Автор активно привлекает литературные данные, полученные на этой мишени, обсуждая собственные результаты.

Ошибка в написании «фосфатидилхолин», которая фигурирует как «фосфотидилхолин», повторяется в тексте несколько раз.

7. Заключение.

По материалам диссертации опубликована 21 работа. Основные результаты исследования по теме диссертации представлены в 3 статьях в журналах перечня ВАК и в одном зарубежном издании. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на различных Международных и Всероссийских симпозиумах, конференциях, съездах и изданы в тезисах. Автореферат и опубликованные работы в достаточно полной степени отражают основное содержание диссертационной работы.

Завершая анализ диссертационной работы А.В. Смолиной, можно заключить, что это исследование посвящено важной научно-практической проблеме, а именно исследованию физико-химических свойств препаратов нового поколения- водорастворимых производных фуллерена C_{60} на терапевтические мишени болезни Альцгеймера. Полученные результаты убедительно продемонстрировали нейропротекторные свойства изученных соединений, ряд из которых можно рекомендовать для дальнейших предклинических испытаний. Особое значение имеют данные о функциях гибридного соединения на основе аминокислотного производного фуллерена C_{60} и присоединенного к нему производного димебона. Такая конструкция позволила сохранить положительные нейропротекторные свойства производного димебона и снять проявление его токсических эффектов на животных. Это соединение вполне может быть рассмотрено как новый перспективный отечественный препарат для лечения болезни Альцгеймера. Обобщая данные, полученные с этим препаратом, автор диссертации предлагает алгоритм создания новых нейропротекторов на основе водорастворимых фуллеренов и физиологически активных соединений, что может привести к созданию целого спектра новых эффективных препаратов с нейропротекторными свойствами. Все сказанное свидетельствует о том, что диссертационная работа А.В. Смолиной **«Физико-химические механизмы действия водорастворимых производных фуллерена C_{60} на терапевтические мишени болезни Альцгеймера»** является законченным научным исследованием, выполненном на высоком экспериментальном уровне, а сделанные в работе выводы убедительны и достоверны. В диссертационной работе решена актуальная задача, которая имеет существенное значение для понимания механизмов действия препаратов нового поколения на основе водорастворимых производных фуллерена C_{60} на терапевтические мишени болезни Альцгеймера, что создает реальные предпосылки для создания эффективных отечественных препаратов для ее лечения. Эти данные представляют большой научный интерес для биофизики и могут быть применены в фармакологии и медицине в качестве подходов для синтеза новых эффективных нейропротекторов и их использования при лечении нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера. **Диссертация Смолиной Анастасии Васильевны**

«Физико-химические механизмы действия водорастворимых производных фуллерена C₆₀ на терапевтические мишени болезни Альцгеймера» представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, удовлетворяющую всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям и п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Алесенко Алиса Владимировна,
доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией нейролипидологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимической физики
им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук

Почтовый адрес:
119334, Москва, ул. Косыгина, 4
Телефон: 8-495-939-71-59
E-mail: ales@sky.chph.ras.ru

Подпись А.В. Алесенко заверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИБХФ РАН, к.х.н. Марина Михайловна Долгая



01.07.2015г.