



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**

**Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и
экспериментальной биофизики
Российской академии наук
(ИТЭБ РАН)**

142290 Пушкино Московской области,
ул. Институтская, 3
Тел. (495) 632-78-69 Факс (4967) 33-05-53
E-mail: office@iteb.ru
ОКПО 00454592, ОГРН 1025007770920
ИНН/КПП 5039002070/503901001

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора Федерального



государственного
бюджетного учреждения науки Института
теоретической и экспериментальной
биофизики Российской академии наук,
член-корреспондент РАН

Г.Р. Иваницкий

«24» июня 2015 года

25.06.15 № 12308/2171-02

На № _____ от _____

Отзыв ведущей организации

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

**Смолиной Анастасии Васильевны «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»

Актуальность темы выполненной работы. Производные фуллеренов привлекают внимание исследователей, как перспективные соединения для разработки лекарственных препаратов. Болезнь Альцгеймера (БА) признана одной из важнейших медико-социальных проблем современности. Это неизлечимое нейродегенеративное заболевание, которое приводит к полному расстройству когнитивных функций. Ключевыми звеньями развития нарушений когнитивных процессов при БА являются глутамат-опосредованное нейровоспаление, окислительный стресс, агрегация β -амилоидных белков и гибель нейронов. К настоящему времени не созданы лекарственные препараты, способные предотвратить развитие БА или вылечить больных. Современные клинические препараты оказывают только симптоматическое действие и, в лучшем случае, на некоторое время задерживают развитие

патологических процессов. Поэтому создание лекарственных препаратов для лечения БА является актуальной и важной задачей современной науки. В связи с этим, актуальность диссертационного исследования Смолиной А.В., цель которого заключалась в комплексном изучении физико-химических механизмов действия водорастворимых производных фуллерена C₆₀ на терапевтические мишени болезни Альцгеймера для создания эффективных лекарственных препаратов, не вызывает сомнения.

Основные результаты выполненной работы. Исследования были проведены с использованием двух групп водорастворимых производных фуллерена C₆₀: полизамещенных производных фуллерена C₆₀ (ППФ), синтезированных П.А. Трошиным (ИПХФ РАН); и гибридных структур на основе аминокислотного производного фуллерена C₆₀ (ГСФ), синтезированных В.С. Романовой (ИНЭОС РАН). Основные результаты исследования, представленные в главе 3 диссертации, следующие:

(1) Методом флуоресцентных зондов проведены исследования взаимодействия трёх ППФ (4,4',4'',4''',4''''-(8-гидро[5,6]фуллерен-C₆₀-Ih-1,7,11,24,27(8H)-пентаил)пентакисфенилуксусной кислоты пентакалиевого соли (I), Фуллеренолята калия (II) и 4,4',4'',4''',4''''-(8-хлоро[5,6]фуллерен-C₆₀-Ih-1,7,11,24,27(8H)-пентаил)пентакисфенилмасляной кислоты пентакалиевого соли (III)) с фосфолипидной мембраной. По характеру тушения флуоресценции водорастворимого зонда 2,7-дибромпрофлавина и гидрофобного зонда пирена производными фуллерена C₆₀ I-III установлено, что ППФ проникают в фосфолипидные мембраны и локализуются как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов модельных мембран;

(2) При исследовании действия ППФ I-III на каталитическую активность MAO-B (моноаминоксидазы B, которая является одним из ключевых ферментов, обеспечивающих метаболизирование в мозге дофамина – нейромедиатора) и процесс свободнорадикального окисления липидов установлено, что ППФ I и II являются эффективными ингибиторами MAO-B и обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью. Полученные результаты свидетельствует о потенциальной способности ППФ I оказывать антидепрессивный эффект и способности ППФ II снимать повышенное возбуждение нервной системы, что может быть важно при лечении БА как с симптомами депрессии, так и повышенного возбуждения;

(3) При исследовании электрофизиологическим методом patch-clamp действия ППФ на амплитуду каинат-вызванных токов AMPA рецепторов обнаружено, что ППФ I и II в диапазоне концентраций 10⁻¹⁰-10⁻⁵ М вызывают позитивную модуляцию ответов AMPA

рецепторов. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальном когнитивно-стимулирующем действии этих полизамещенных производных фуллерена C₆₀.

(4) Обнаружено, что при введении в дозе – 1 мг/кг ППФ I и II улучшали память животных (мышей), что свидетельствует о когнитивно-стимулирующем действии этих производных фуллерена C₆₀;

(5) В разделе 3.2. диссертации описаны исследования влияния гибридных структур на основе аминокислотных производных фуллерена C₆₀ (ГСФ) на терапевтические мишени болезни Альцгеймера и поведение животных. Показано, что ГСФ V (Метилловый эфир N-[(нитроксиэтил) фуллеренил] пролина) и VI (Метилловый эфир N-[(1,2-динитроксипропил) фуллеренил] пролина) являются конкурентными ингибиторами MAO-B (моноаминоксидазы B) с константами ингибирования реакции дезаминирования бензиламина – $K_i(V)=0.47 \cdot 10^{-6}$ М, $K_i(VI)=1.41 \cdot 10^{-6}$ М. Обнаружено, что в концентрации 10^{-5} М ГСФ V и VI ингибируют образование МДА (малонового диальдегида) в гомогенате головного мозга мышей на 43 и 27%, соответственно, что свидетельствует об антиоксидантных свойствах этих соединений.

(6) Методом радиолигандного связывания с ионотропными глутаматными NMDA рецепторами ЦНС млекопитающих в работе изучалось действие соединения-лидера ГСФ VI на функциональное состояние этих рецепторов. Установлено, что ГСФ VI в диапазоне концентраций 10^{-9} - 10^{-6} М в условиях *in vitro* не влияет на связывание радиоактивных лигандов с рецепторами (рис. 3.20), то есть не оказывает действия на функционирование NMDA рецепторов. Этот результат позволяет предполагать, что ГСФ VI не обладает нейротоксичным действием.

(7) Поведенческие тесты подтвердили улучшение когнитивных функций животных под действием ГСФ VI, что позволяет рассматривать это соединение в качестве терапевтически перспективного для создания на его основе лекарственных препаратов для лечения БА и улучшения когнитивных процессов.

(8) В разделе 3.2.4. диссертации описаны результаты исследований влияния ГСФ VIII (метилловый эфир N-{цис-2,3,4,4a,5,9b-гексагидро-5-(фенилметил)-1H-пиридо[4,3b]-8-индолил}фуллеренил-L-пролина) на терапевтические мишени болезни Альцгеймера и поведение животных. Установлено, что ГСФ VIII обладает антиоксидантным действием, ингибирует (на 26%) каталитическую активность MAO-B в гомогенате головного мозга мышей, а также активирует работу MAO-A (моноаминоксидазы A), что приводит к снижению нервного возбуждения животных.

Теоретическая значимость исследования и научная новизна полученных результатов не вызывает сомнения. Получены новые интересные результаты, которые показали, что

рассматриваемые соединения (ППФ и ГСФ), в отличие от применяемых в современной клинике препаратов, воздействуют на несколько ключевых звеньев развития нейродегенеративного процесса: являются эффективными ингибиторами MAO-B, проявляют выраженную антиоксидантную и антирадикальную активность, выступают позитивными модуляторами AMPA рецепторов, не обладают нейротоксичностью, улучшают память млекопитающих и, вместе с тем, обладают хорошей растворимостью в воде, проникают в фосфолипидную мембрану и мало токсичны. Полученные результаты свидетельствуют о том, что представители класса водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C₆₀ (ППФ I и II, ГСФ VI) могут быть рекомендованы для дальнейших исследований в качестве соединений для разработки на их основе препаратов для лечения БА и других нейродегенеративных патологий, сопровождающихся нарушением когнитивных функций.

Полученные результаты имеют большое **научно-практическое значение**. Результаты диссертационной работы свидетельствуют о перспективности развития направления создания гибридных структур на основе фуллеренов и биологически активных соединений, проявляющих терапевтическое действие на мишени социально значимых заболеваний, с целью разработки эффективных лекарственных препаратов.

Внедрение в практику. Результаты данной работы позволяют рекомендовать ряд производных фуллерена C₆₀ для дальнейших исследований с целью создания на их основе препаратов для лечения нейродегенеративных патологий (в частности, болезни Альцгеймера), а также других заболеваний, сопровождающихся нарушениями когнитивных функций. Результаты исследования могут быть приняты во внимание медицинскими специалистами различного профиля при диагностике и лечении нейродегенеративных патологий.

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, экспериментальную часть, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы (291 библиографическую ссылку). Работа содержит 30 рисунков и 4 таблицы. Обзор литературы (глава 1.) посвящен описанию производных фуллерена и их свойствам, описанию болезни Альцгеймера и терапевтических мишеней БА. Обзор литературы хорошо проиллюстрирован, понятно и лаконично написан.

Методическая часть работы (глава 2.) описана подробно и при необходимости может быть воспроизведена заинтересованными лицами. Методы, используемые в работе, соответствуют современному научному уровню. Полученные результаты и выводы не вызывают сомнений. По материалам диссертации опубликована 21 работа, из них 4 статьи в научных рецензируемых журналах: отечественных (входящих в перечень Высшей аттестационной


комиссии Министерства образования и науки РФ) и иностранном. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний к содержанию работы нет, однако имеется ряд замечаний технического характера к оформлению диссертации и автореферата. В представленных в диссертационной работе и автореферате таблицах не указано значение n (количество повторов). Спорным, на наш взгляд, выглядит утверждение автора о том, что антирадикальная активность ГСФ определяется только акцепторными свойствами фуллеренового сфероида и не зависит от аддендов. Однако эти замечания не являются принципиальными и не снижают высокой научной ценности и значимости представленной диссертационной работы.

Заключение. Диссертационная работа Смолиной Анастасии Васильевны на тему: «Физико-химические механизмы действия водорастворимых производных фуллерена C_{60} на терапевтические мишени болезни Альцгеймера» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Отзыв обсужден и утвержден на научном семинаре лаборатории Структуры и функций мышечных белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук 3 апреля 2015 года (протокол заседания № 1/15).

Зав. лабораторией Структуры и функций мышечных белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Заслуженный Деятель Науки РФ,
Доктор биологических наук, профессор
Адрес: 142290, г. Пущино Московской обл., микрорайон «Г», дом 25, кв. 23.
Телефон: 8(4967)739334, e-mail: podlubnaya@iteb.ru

 Подлубная Зоя Александровна

Ведущий научный сотрудник лаборатории Структуры и функций мышечных белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
доктор биологических наук
Адрес: 142290, г. Пущино Московской обл.,



Вихлянцев Иван Милентьевич

микрорайон «АБ», дом 4, кв. 27.
Телефон: 8(4967)739334, сотовый: +7 925 2874090
e-mail: vikhlyantsev@iteb.ru

Подписи З.А. Подлубной и И.М. Вихлянцева заверяю
Ученый секретарь ИТЭБ РАН,
доктор биологических наук



Куликов Александр Владимирович

Контактные данные организации: 142290, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 3
Тел. 8(4967) 739-334, Сотовый: +7 925 2874090, E-mail: vikhlyantsev@mail.iteb.ru