

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Золотовой Алены Сергеевны на соискание ученой степени кандидата химических наук на тему:
«Биосовместимые носители для транспортировки радионуклидов меди и антиопухолевых агентов» по специальности 1.4.13 Радиохимия

Актуальность темы исследования. Онкологические заболевания занимают в мире второе место по смертности, уступая лишь заболеваниям сердечно-сосудистой системы. Невзирая на значительные усилия, предпринимаемые современной наукой в исследованиях этих заболеваний, разработке методов их профилактики и лечения, ситуация остается достаточно сложной. Одним из важнейших подходов к лечению онкологических заболеваний является использование ионизирующей радиации. В настоящее время важнейшей задачей радиотерапии является разработка и совершенствование диагностических и терапевтических радиоактивных препаратов, а также тераностических препаратов, которые могут быть использованы одновременно для диагностики и лечения.

Диссертационная работа Золотовой Алены Сергеевны представляет собой исследование, в котором предпринята попытка создания комплексного фармакологического радиопрепарата на основе сочетания различных форм гидроксипатита и карбоксицеллюлозы с ионами меди (^{67}Cu) и модуляторами NO-синтазы. Автором получены и исследованы физико-химические свойства полученных комплексов наноносителя и ионов меди, а также комплексов наноносителя с ионами меди и органическими соединениями, являющимися модуляторами активности NO-синтазы, изучены процессы сорбции и десорбции ионов меди в различных условиях, а также проведена оценка цитотоксичности и выведения исследуемых комплексов в условиях *in vitro* на культурах злокачественных клеток крови и *in vivo* на экспериментальных животных (мышях). Таким образом, **исследование, проведенное Золотовой А.С.**, цель которого сформулирована как разработка и испытание *in vitro* и *in vivo* двойных и мультифункциональных композиций на основе наноплатформ разного состава, содержащих в качестве антиопухолевого препарата модуляторы активности NO-синтазы и радионуклиды меди, **является, безусловно, актуальным,**

а полученные диссертантом данные имеют как фундаментальное, так и важное прикладное значение.

Структура диссертационной работы. Диссертационная работа Золотовой Алены Сергеевны построена по классическому образцу и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение», а также содержит «Выводы», «Заключение» «Список литературы», включающий 224 ссылки, и «Приложения». Основная часть работа (без «Приложений») иллюстрирована 78 рисунками и содержит 30 таблиц. Полный текст диссертационной работы представлен на 146 страницах.

Во **«Введении»** диссертационной работы Золотовой Алены Сергеевны кратко описаны основные направления в разработке современных радиофармпрепаратов, а именно: получение и использования короткоживущих изотопов, связанных с носителем (хелатором) и вектором для адресной доставки радионуклида, а также с дополнительным противоопухолевым агентом. Далее сформулированы цель и задачи работы, описана научная новизна и положения, выносимые на защиту. Кроме того, автор сообщает о практической и теоретической значимости работы, описывает методологию и основные методы исследования, сообщает о степени достоверности полученных данных, апробации результатов и соответствии паспорту научной специальности, а также сообщает о своем личном вкладе в исследование и о количестве опубликованных работ по теме диссертации.

В **«Обзоре литературы»** диссертационной работы Золотова Алена Сергеевна описывает роль ионов меди в функционировании организма млекопитающих, включая человека, отдельные белки, участвующие в транспорте и депонировании меди в клетках, цитотоксическое действие ионов меди на раковые клетки, а также их влияние на воспалительные процессы и развитие некоторых заболеваний, включая остеопороз и нейродегенеративные заболевания. Рассмотрены лекарственные препараты на основе меди, причем существенное внимание автор уделяет характеристике органических хелаторов меди с различной биологической активностью. Описаны изотопы и радионуклиды меди ^{64}Cu и ^{67}Cu , способы их получения, комплексы этих радионуклидов с органическими соединениями, а также перспективы комплексного применения радионуклидов меди в диагностических и терапевтических целях и способы их направленной доставки. Подробно рассмотрены

биосовместимые носители препаратов на основе гидроксиапатита, а также полимерных микрогелей, в частности, альгинатов и карбоксиметилцеллюлозы, описано их влияние на фармакокинетику и биораспределение лекарств. Кроме того, автор подробно рассматривает данные об использовании эффекторов NO-синтазы в канцерогенезе и в антиопухолевой терапии: в обзоре литературы приведены данные об исследованиях *in vitro* на лейкемических клеточных линиях ряда ингибиторов NO-синтазы. В целом обзор диссертационной работы содержит значительное количество хорошо проанализированной информации по теме работы и подготавливает читателя к пониманию полученных автором результатов и их роли в развитии современных тенденций в области темы исследования.

В разделе «**Экспериментальная часть**» диссертант подробно описывает использованные в работе методы, включая введение ионов меди в гидроксиапатит, исследование кинетики сорбции и десорбции ионов меди на этом носителе, сорбции и десорбции на гидроксиапатите органических лигандов (2-аминопиридина, N-(5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазин-2-ил)бензамида и N-(4-изопропил-фенил)-N-(1-имминоэтил)-пиперидин-1-карботиоамид гидробромида), а также сокристаллизационное введение указанных лигандов в гидроксиапатит. Кроме того, описано исследование одновременной и последовательной сорбции N-(5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазин-2-ил)бензамида и бычьего сывороточного альбумина на гидроксиапатите.

Подробно рассмотрены методы, использованные для получения комплексов Cu^{2+} с указанными выше органическими лигандами, получение и выделение радионуклидов меди. Описан потенциометрический метод определения констант протонирования лигандов, а также флуориметрический метод определения констант связывания лигандов в комплексах и метод масс-спектрометрии LETDI (Laser Induced Electron Transfer Desorption/Ionization), использованный для идентификации полученных соединений, и рентгеноструктурный анализ полученных образцов.

Приведена информация об исследовании двойных и тройных микрогелей на основе карбоксиметилцеллюлозы, определение в них содержания меди, гидродинамических и электрокинетических характеристик двойных и тройных комплексов на основе микрогелей, оценка содержания в них органических лигандов. Описано также получение микрогелей, меченых ионами радиоактивной меди и тритием, а также определение их радиостойчивости. Таким образом, в работе

использован широкий набор современных методов анализа: спектрофотометрия, потенциометрическое титрование, тонкослойная хроматография, гамма- и жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия, цифровая автордиография, инфракрасная спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ и электронная микроскопия.

Помимо этого, диссертантом подробно описана пробоподготовка органов мышечной ткани, получивших исследуемые препараты, и исследование их распределения в органах мышечной ткани. Приведена информация об использованных при проведении биологических экспериментов методах проточной цитофлуориметрии, оценки жизнеспособности клеток с использованием МТТ-теста и получении и инкубации мононуклеарных клеток. Объем использованных методических приемов впечатляет и свидетельствует о высокой квалификации автора исследования Золотовой Алены Сергеевны как экспериментатора.

Раздел диссертационной работы **«Результаты и их обсуждение»** представляет наибольший интерес, поскольку в нем описаны основные достижения рецензируемой работы. Во-первых, проведена сорбция ионов меди на гидроксиапатите, полученном разными методами (ферментативным путем с использованием щелочной фосфатазы и методом осаждения), с использованием двух подходов для введения иона (адсорбционный и сокристаллизационный), после чего исследованы свойства полученных частиц. Проведено сравнение полученных наночастиц гидроксиапатит-медь с аналогичными наночастицами, содержащими ионы цинка, и установлено, что ионы меди оказывают большее влияние на формирование наночастиц гидроксиапатита по сравнению с ионами цинка. Отмечено также, что ферментативно полученный образец гидроксиапатита формирует сферические микрочастицы с высокой пористостью, что увеличивает его сорбционную емкость.

Далее автором показана возможность использования гидроксиапатита в качестве носителя радиоактивных ионов меди (^{67}Cu) для медицинских целей путем изучения кинетики их сорбции и десорбции в разных средах, в том числе и в присутствии альбумина в качестве молекулы крови, связывающей ионы меди. К сожалению, сорбции исследуемых органических лигандов на гидроксиапатите не происходит, в связи с чем в дальнейшем для разработки тройных комплексов использовались наночастицы карбоксиметилцеллюлозы. Тем не менее, было

показано, что гидроксипатит является удобным носителем для радионуклидов меди. Полученные и исследованные комплексы гидроксипатита с ионами меди могут быть востребованы как диагностический или терапевтический инструмент при заболеваниях скелета. Однако в качестве полифункционального носителя гидроксипатит оказался менее перспективным.

На следующем этапе работы проведено введение различными способами органических лигандов 2-аминопиридина (AP), N-(5,6-дигидро-4H-1,3-тиазин-2-ил)бензамида (L1) и N-(4-изопропил-фенил)-N-(1-имминоэтил)пиперидин-1-карботиоамид гидробромида (L2), а также комплексов этих органических соединений с ионами меди в гидроксипатит. Диссертантом изучены кристаллические структуры комплексов меди с ингибитором индуцибельной NO-синтетазы (лиганд L1) и показано, что структура и степень окисления меди в комплексах зависит от соотношения реагентов, а цитотоксичность полученных комплексов определяется не только состоянием ионов меди, но и кристаллической структурой комплекса.

Далее автором получены двойные (карбоксимелилцеллюлоза-Cu) и тройные (карбоксиметилцеллюлоза-Cu-эффектор NO-синтетазы) микрогели и *in vitro* показана их цитотоксичность и терапевтический индекс по отношению к линии лейкемических клеток. Кроме того, получены двойные микрогели, меченные ^{67}Cu и тритием, и установлено их распределение в организме мышей *in vivo*, а также их радиационная стабильность. Эти эксперименты показали, что полученные микрогели способны выводиться из организма (мышей) через почки и, по-видимому, в меньшей степени через желудочно-кишечный тракт. Микрогели карбоксиметилцеллюлозы с Cu^{2+} продемонстрировали высокую радиационную стабильность.

Следует отметить, что ранее различными исследователями было сделано несколько систематических попыток найти для органических комплексов меди корреляцию между антиопухолевой активностью *in vitro* и особенностями комплексов, в частности, пытались обнаружить корреляцию со степенью окисления меди, координационным числом или геометрией соединения для установления роли лигандов и металлов в антиопухолевом действии. Однако до сих пор рациональное конструирование антиканцерогенных органических комплексов с ионами меди не разработано. Рецензируемая работа представляет собой важную попытку разработки тройных комплексов меди с подбором носителя и органического лиганда, которая

привела к получению существенного результата: более широкого терапевтического окна в действии комплексов на здоровые и раковые клетки крови.

Количество полученных экспериментальных данных, тщательность проведения экспериментов и достигнутые результаты, а именно: получение эффективно действующих антиканцерогенных комплексов органических лигандов с радионуклидами меди на наночастицах карбоксицеллюлозы, которые способны выводиться из организма животных, свидетельствует о высокой квалификации диссертанта Золотовой Алены Сергеевны. Следует отметить, что результаты настоящей работы подробно опубликованы: Золотова А.С. является соавтором 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в МГУ имени М. В. Ломоносова. Невзирая на высокую оценку этой работы, к автору есть некоторые вопросы и замечания.

1. Диссертант в обзоре литературы указывает, что «медь имеет независимую систему входа в клетку, что дает возможность биологически активным соединениям, содержащим ионы меди, проникать через клеточную поверхность без связывания с другими проводящими агентами». При этом приводится ссылка на публикацию C. Santini, et al., Chem. Rev., 2014, 114, (1), 815. Это утверждение предполагает, что мембранный переносчик Ctr1, обеспечивающий вход Cu^+ в клетку, способен переносить его в комплексе с органическими соединениями. Однако эта точка зрения не является доказанной, на сегодняшний день в литературе есть устоявшееся мнение, что перенос ионов Cu^+ в клетку через Ctr1 осуществляется без органического соединения, по-видимому, за счет связывания иона с переносчиком, обладающим высоким сродством к одновалентным катионам меди. Не исключено, что комплексы органических лигандов с ионами меди также способны переноситься в клетку, но через другие переносчики, являющиеся членами огромного семейства SLC.

2. Автор отмечает двойственность влияния на метаболизм как NO, так и ингибиторов NO-синтазы, и указывает, что их использовании в терапии требует строгого баланса выработки NO, любое нарушение которого может приводить развитию различных заболеваний, в частности, гипертонической болезни. В связи с этим **включение ингибиторов NO-синтазы в комплексы, которые предполагается использовать для лечения онкологических заболеваний клеток**

крови, может привести не только к улучшению их антиканцерогенной активности, но и к существенным побочным эффектам. В частности, ингибиторы NO-синтазы тройного комплекса в организме будут контактировать с клетками эндотелия сосудов. Подавление активности этого фермента в эндотелии может привести к уменьшению диаметра сосудов и к значительному повышению артериального давления.

3. В качестве транспортной молекулы крови в экспериментах по определению устойчивости комплексов автор использовал бычий сывороточный альбумин. Действительно, альбумин, основной белок плазмы крови, связывает ионы меди и количество этого белка в крови значительна. Однако в крови присутствуют и другие белки, связывающие ионы меди в большом количестве и с высоким сродством, в частности, специфический переносчик меди церулоплазмин. Это отмечается также в цитируемой в диссертации работе С. Santini, et al.: «distribution of copper is regulated by the liver into the bloodstream through ceruloplasmin and albumin». По-видимому, для экспериментов по изучению устойчивости комплексов лучше использовать плазму крови, содержащую не только бычий сывороточный альбумин, но и другие белки, являющиеся переносчиками ионов меди.

4. К сожалению, диссертация написана довольно сложным языком, иногда с очень трудными оборотами, что затрудняет понимание. В тексте диссертации есть некоторые грамматические и стилистические ошибки. Кроме того, некоторые рисунки достаточно мелкие и не очень разборчивые.

5. Желательно указать, как проводился статистический анализ результатов.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация безусловно отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.13 - Радиохимия (химические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Таким

образом, соискатель Золотова Алена Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.13 Радиохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Лопина Ольга Дмитриевна

24 февраля 2026 года