

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
Санкт-Петербургского
государственного университета



С.В. Микушев

20 19 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу

Сорокиной Светланы Анатольевны

**«ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАТИОННЫХ
ПИРИДИЛФЕНИЛЕНОВЫХ ДЕНДРИМЕРОВ С
АМИЛОИДОГЕННЫМ БЕЛКОМ»,**

представленной на соискание ученой степени

кандидата химических наук

**по специальностям: 02.00.06 – высокомолекулярные соединения
и 03.01.04 - биохимия**

Диссертационная работа Сорокиной С.А. посвящена синтезу новых катионных пиридилфениленовых дендримеров и изучения их взаимодействия с амилоидогенным белком - рекомбинантным овечьим прионом. Основной целью работы является выявление потенциальной способности пиридилфениленовых дендримеров (второй, третьей и четвертой генераций) влиять на амилоидную агрегацию белков, а также исследование механизмов взаимодействия белок – дендример. Повышенный интерес к биологическому применению дендримеров, обусловлен особенностями из строения. Действительно, дендримеры сочетают в себе

свойства макромолекул и частиц, при этом обладают точно регулируемыми нанометровыми размерами (монодисперсностью по размерам), большим числом функциональных групп на поверхности, возможностью их дальнейшей модификации, наличием полостей, способностью формировать комплексы «гость-хозяин». Возможности модификации поверхности дендримеров различными функциональными группами обуславливает их применимость в качестве векторов для доставки генетического материала, направленных носителей лекарственных средств, новых противовирусных и антибактериальных, противовоспалительных и анти-амилоидных агентов. Особое место в изучении биологической активности дендримеров связано с исследованием их взаимодействий с белками. Белки, с одной стороны выполняют важнейшие функции в организме, а с другой - структурная конверсия белков и связанное с ней формирование амилоидных фибрилл у человека ведут к развитию нейродегенеративных заболеваний, многие из которых в настоящий момент не имеют эффективных способов лечения. В этой связи важными представляются исследования по уменьшению цитотоксического эффекта амилоидов и небольших агрегатов, а также поиске путей ингибирования амилоидной агрегации белков. В качестве веществ, препятствующих агрегации белков используются как низкомолекулярные, так и полимерные агенты (последние показали большую эффективность связывания). Однако, полидисперсность синтетических полимеров затрудняет исследование образующихся белок-полимерных комплексов и интерпретацию полученных результатов. В этой связи, очевидными преимуществами обладают дендримеры – которые практически монодисперсны. Таким образом, проведенные в рецензируемой работе исследования, несомненно актуальны.

Научная новизна работы состоит в том, что в ней впервые проведено изучение взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидным прионным белком. Экспериментально доказана возможность использования этих дендримеров для предотвращения белковой агрегации, а также для разрушения уже сформировавшихся агрегатов. Показана, что

токсичность пиридилфениленовых дендримеров ниже, чем у амидоаминных или этилениминовых дендримеров.

Практическая значимость полученных результатов состоит в том, что они могут быть использованы для дальнейшей разработке новых лекарственных средств на основе дендримеров.

Диссертация состоит из введения, 3-ех глав, заключения, выводов, списка условных обозначений и сокращений, и списка литературы. Материал диссертации изложен на 193 страницах, включая 54 рисунков и 6 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 249 наименований.

Во введении дается обоснование актуальности диссертационной работы, формулируются цели и задачи исследования, аргументируется научная новизна работы, ее практическая.

В первой главе представлен литературный обзор об основных классах дендримеров с потенциальной биологической активностью, а также изложены современные представления о механизмах развития нейродегенеративных заболеваний. Отмечу, что глава написано очень подробно, но при этом не перегружена лишним материалом. Крайне удачным, на мой взгляд, является решение автора систематизировать имеющиеся сведения о механизмах взаимодействия дендримеров с белками в виде таблицы (табл. 1 диссертации).

Во третьей главе описывается методика синтеза дендримеров, их очистка, способы формирования комплексов дендример-белок, а как же описано оборудование и методики, с помощью которых выполнены эксперименты.

Вторая глава основная и содержит полученные результаты, их обсуждение и интерпретацию. Вначале подробно описан синтез водорастворимых пиридилфениленовых дендримеров второй, третьей и четвертой генерации. Проведено исследование их характеристик в растворах методами динамического светорассеяния и спектроскопии. Показано, что при фракционировании в асимметричном потоке поля дендримеры обладают различным временем удерживания. Также пространственная структура дендримеров смоделирована методом молекулярной динамики. Далее

подробно рассматриваются эксперименты по взаимодействию дендримеров с нативным прионом. Автор использует методики динамического рассеяния света, кругового дихроизма, флюоресценции для изучения размеров и структуры комплексов, а также их стабильности. В результате этих исследований было показано, что катионные пиридилфениленовые дендримеры способны формировать прочные комплексы с овечьим прионным белком. Особо отмечу, что в работе на основе экспериментальных данных и моделирования установлено, что движущей силой взаимодействия являются электростатические силы, однако гидрофобные взаимодействия также вовлечены в связывание и обуславливают высокую стабильность комплекса.

Далее в главе рассматривается способность дендримеров препятствовать белковой агрегации, что, несомненно, важно при создании новых лекарственных препаратов. На основании полученных физико-химических характеристик исследуемых систем было обнаружено, что дендримеры способны предотвращать как формирование небольших, но наиболее токсичных амилоидных агрегатов – олигомеров, так и зрелых амилоидных фибрилл. Установлено, что ингибирование олигомеризации было вызвано связыванием дендримеров с сайтом, вовлеченным в амилоидную трансформацию прионного белка, и формированием прочных комплексов дендример-прионный белок. Это взаимодействие в дальнейшем блокировало более глубокую агрегацию – формирование амилоидных фибрилл. Этот эффект зависел от генерации дендримера (дендример третьей генерации показал наивысшую активность). Важно, что дендримеры были активны при нейтральном значении pH среды, что говорит о том, что структурные свойства дендримеров, а именно постоянство заряда и жесткость, играют важную роль в проявлении анти-амилоидных свойств.

Далее в работе исследуется возможность дендримеров разрушать уже существующие белковые агрегаты. Показано, что катионные пиридилфениленовые дендримеры способны разрушать белковые агрегаты амилоидной природы, приводя к образованию растворимых комплексов

белок-дендример. За счет жесткой структуры дендримера, а также постоянству заряда разрушение эффективно происходило при физиологическом значении $pH = 7,4$. Способность разрушать белковые агрегаты возрастает с номером генерации, а полученные комплексы не были подвержены повторной агрегации в течение последующих пяти дней. Таким образом, данные дендримеры могут быть использованы в широком диапазоне pH и их действие на амилоидные агрегаты при этом будет оставаться неизменным. Также в работе продемонстрировано, что пиридилфениленовые дендримеры проявляют меньшую токсичность по сравнению с часто используемыми ПАМAM и ПЭИ дендримерами, по всей видимости, за счет кватернизации азота.

Таким образом, диссертационная работа Сорокиной С.А. является экспериментальным и теоретическим исследованием новых водорастворимых катионных пиридилфениленовых дендримеров, а также их комплексов с прионными белками. Показана способность дендримеров эффективно препятствовать агрегации белков, а также разрушать уже существующие агрегаты. Этот результат принципиально важен, так как создает прекрасные предпосылки к использованию обнаруженных эффектов при создании новых поколений высокоэффективных лекарственных препаратов. Достоверность полученных экспериментальных результатов подтверждается их успешной интерпретацией и трактовкой в рамках существующих физическо-химических моделей и теорий. Значительная часть результатов исследований получена впервые. Изложенные в диссертации результаты не противоречат данным, опубликованным другими авторами в научной периодике, а также докладам, представленным на научных конференциях.

Основные результаты диссертации представлены в 4 статьях в высокорейтинговых научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus. Результаты неоднократно апробированы на международных и всероссийских конференциях. Автореферат отражает основное содержание диссертации.

При прочтении работы возникают следующие замечания и вопросы:

1. В диссертации присутствует незначительное количество опечаток. Например на страницах 12, 35, 96, 155.
2. Автор в диссертации постоянно использует термин динамическое лазерное светорассеяние. Вместе с тем, англоязычная аббревиатура DLS (dynamic light scattering) переводится как динамическое рассеяние света. Этот же термин принято использовать и в русскоязычной литературе. При этом подчеркивать, что во всех современных установках по светорассеянию источником света является лазер, нет необходимости.
3. Данные, полученные в работе методом динамического рассеяния света (стр. 70 и далее), для растворов дендримеров выглядят не очень убедительно. Гидродинамические диаметры для дендримеров второй третьей и четвертой генераций получились равными 5, 5 и 32 нм соответственно. Очевидно, что в случае дендримера четвертой генерации этот размер соответствует агрегатам (на это указывается в работе). Однако почему для дендримеров 2 и 3 генераций гидродинамические размеры совпали? Комментарии в работе отсутствуют. Кроме того, учитывая склонность этих дендримеров к агрегированию, возможно, стоило уделить больше внимания экспериментам по динамическому рассеянию света – провести исследования под разными углами и попытаться все же найти индивидуальные молекулы дендримера четвертой генерации в растворе. Это облегчило бы дальнейшую интерпретацию данных по рассеянию комплексов дендример – белок. Так, для комплекса дендример 4 генерации с белком в работе (на стр. 83, рис. 30) получен гидродинамический размер в 18 нм, что вдвое меньше размера исходного дендримера (а точнее его комплекса). Как это можно объяснить? Разрушением комплекса дендримера в присутствии белка? Пояснения в тексте диссертации отсутствуют.
4. На странице 80-81 диссертации говорится «Связывание дендримеров с основной цепью вызывало перестройку N- и C-концевых фрагментов, а также участка, включающего аминокислотные остатки 190-200. Структурные изменения повлекли за собой и изменения во вторичной структуре: частично

пропал участок 175-160 альфа-спирали. Взаимодействие с G3 также приводило к изменениям участка 130-170». А чуть дальше по тексту (стр. 84) говорится «... согласно результатам КД спектроскопии, взаимодействие дендримеров с прионным белком не оказывает значительного влияния на его вторичную структуру и не вызывает разворачивания, либо денатурации белка». Как эти два фрагмента соотносятся друг с другом?

Высказанные замечания, не влияют на положительную оценку результатов диссертационной работы.

В целом диссертационная работа Сорокиной Светланы Анатольевны представляет собой законченное, систематическое и важное исследование в области экспериментальных и теоретических исследований свойств новых водорастворимых катионных пиридилфениленовых дендримеров, а также их комплексов с прионными белками. В ней получен принципиально важный и актуальный результат о возможности исследованных дендримеров эффективно препятствовать агрегации белков, а также разрушать уже существующие агрегаты. Результаты, полученные Сорокиной С.А., являются новыми, а их достоверность обусловлена корректной постановкой задач, применением современных методов исследования, хорошей воспроизводимостью и согласованностью данных. Работа выполнена на высоком научном уровне. Сформулированные в диссертации выводы основываются на тщательном анализе большого объема проведенных экспериментальных исследований.

Результаты работы Сорокиной С.А. могут быть использованы в организациях, занимающихся разработкой и исследованием характеристик полимерных материалов, в том числе с биологической активностью, в частности, в Федеральных государственных бюджетных образовательных учреждениях высшего профессионального образования: Московском государственном университете, Санкт-Петербургском государственном университете, Нижегородском государственном университете, Томском государственном университете, Российском химико-технологическом университете им. Менделеева, в Федеральных государственных бюджетных

учреждениях науки: в институте Высокомолекулярных соединений РАН, Институте синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Физико-техническом институте им. Иоффе, НИЦ «Курчатовский институт».

Диссертация Сорокиной Светланы Анатольевны на тему «Особенности взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидогенным белком» удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пункты 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор Сорокина Светлана Анатольевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 – высокомолекулярные соединения и 03.01.04 - биохимия.

Отзыв ведущей организации обсужден и одобрен на основании изучения текста диссертации, а также доклада Сорокиной С.А. на заседании кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров Санкт-Петербургского государственного университета от 23.04.2019 протокол № 88.08/21-04-04.

Отзыв составил

Зав. кафедрой молекулярной
биофизики и физики
полимеров, доктор физико-
математических наук,
профессор

Цветков Николай Викторович
199034 г. Санкт-Петербург,
Университетская наб. 7/9

ФБГОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет»

тел. раб. 812-428-7598,
n.tsvetkov@spbu.ru

