

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Солдатовой Юлии Валериевны «ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПЕНТААМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА C<sub>60</sub> НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МИШЕНИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

### Об актуальности предмета исследования

В диссертационной работе Солдатовой Юлии Валериевны проведены исследования по влиянию нового класса водорастворимых пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> на процессы перекисного окисления липидов, неферментативного гликирования бычьего сывороточного альбумина, каталитическую активность ферментов полиольного пути метаболизма глюкозы (альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы) *in vitro*, а также влияние *in vivo* калиевой соли фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина на содержание глюкозы в крови у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа с целью выяснения возможности использования вышеуказанных производных фуллерена C<sub>60</sub> в качестве новых лекарственных препаратов. Поскольку многие известные клинические препараты для лечения сахарного диабета оказывают либо симптоматическое действие, либо проявляют серьезные побочные эффекты, несомненно, что поиск новых веществ, способных снижать прогрессирование негативных последствий при развитии сахарного диабета 2 типа или предотвращать развитие заболевания, является актуальной задачей современной биологии и медицины.

### О структуре диссертации

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (245 библиографических ссылок). Работа содержит 26 рисунков, 5 схем и 7 таблиц.

Обзор литературы (глава 1) написан без перегрузки деталями и достаточно хорошо проиллюстрирован. Раздел 1.1 посвящен описанию производных фуллерена и способов получения их водорастворимых форм; описаны биологические свойства производных фуллерена (агрегация в водных растворах, мембранотропные свойства, токсичность фуллерена C<sub>60</sub> и его производных, антиоксидантная активность, влияние на активность ферментов). Раздел 1.2 посвящен описанию сахарного диабета 2 типа (СД2) и его патогенеза. Представлены литературные данные о роли окислительного стресса

(вызванного, в том числе, повышенным уровнем свободных жирных кислот при гипергликемии) в развитие сахарного диабета 2 типа, данные о путях метаболизма глюкозы, а также данные о роли альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы в развитии СД2. Раздел 1.3 посвящен описанию экспериментальных моделей сахарного диабета 2 типа, в том числе, модели с использованием стрептозотоцина и высокожировой диеты у крыс.

Глава 2 посвящена методологии и методам исследования. Для *in vitro* исследований были выбраны следующие водорастворимые пентааминокислотные производные фуллерена C<sub>60</sub>, синтезированные А.В. Жиленковым под руководством П.А. Трошина в ИПХФ РАН: калиевая соль фуллеренилпента-аминоуксусной кислоты, калиевая соль фуллеренилпентаамино-1-этилмеркаптометил-уксусной кислоты, калиевая соль фуллеренилпента-N-пирролидин- $\alpha$ -карбоновой кислоты (фуллеренилпентапролин), калиевая соль фуллеренилпента-2-амино-3-гидроксипропановой кислоты, калиевая соль фуллеренилпента-N-аминоянтарной кислоты и калиевая соль фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина.

Исследование взаимодействия вышеуказанных производных фуллерена C<sub>60</sub> с модельной мембраной фосфатидилхолиновых липосом проводили методом флуоресцентных зондов, описанным в работе [Kotelnikova et al., FEBS Lett, 1996]. В качестве люминесцентных зондов использовали гидрофильный зонд 2,7-дибромпрофлавин, имеющий один положительный заряд, и гидрофобный зонд пирен, не имеющий зарядов. Определение интенсивности перекисного окисления липидов в гомогенате головного мозга мышей *in vitro* проводили путём измерения содержания в образцах малонового диальдегида. Исследование влияния производных фуллерена C<sub>60</sub> на интенсивность перекисного окисления липидов в гомогенате головного мозга мышей *in vitro* проводили методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Активность альдозоредуктазы при действии исследуемых соединений определяли по модифицированной автором с коллегами методике [Курмаз и др., Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2021]. Определение активности сорбитолдегидрогеназы в сыворотке крови в присутствии исследуемых соединений проводили по реакции с резорцином (по методу Севела-Товарека). Исследования *in vivo* действия калиевой соли фуллеренилпента-N-3- гидрокси-L-тирозина проводили на крысах, СД2 у которых моделировался методом сочетанного применения высокожировой диеты и стрептозотоцина.

Эти и другие методы, используемые в работе, описаны достаточно подробно, что важно, поскольку это позволит заинтересованным исследователям воспроизвести необходимые экспериментальные условия.

### Научная новизна исследования

Глава 3 посвящена полученным результатам и их обсуждению. Первый этап работы заключался в исследовании взаимодействия исследуемых производных фуллерена C<sub>60</sub> с фосфолипидной мембраной. Методом флуоресцентных зондов было обнаружено, что изучаемые производные фуллерена C<sub>60</sub> были локализованы как в области полярных головок, так и в области жирнокислотных остатков фосфолипидов мембраны фосфатидилхолиновых липосом, на основании чего был сделан вывод о способности вышеуказанных производных фуллерена C<sub>60</sub> включаться в липосомальные мембраны.

Следующая задача работы состояла в исследовании влияния производных фуллерена C<sub>60</sub> на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате головного мозга мышей *in vitro*. В частности, оценивалась способность изучаемых производных фуллерена C<sub>60</sub> ингибировать ПОЛ по изменению содержания малонового диальдегида. Кроме этого, влияние вышеуказанных производных фуллерена C<sub>60</sub> на процесс ПОЛ оценивали методом хемилюминесценции по изменению хемилюминесценции люминола, опосредованной взаимодействием хромофора со свободными радикалами, образование которых инициируется *трет*-бутилгидропероксидом [Фархутдинов, Лиховских – Уфа: БГМУ, 1995. – 90]. Было обнаружено, что все шесть исследуемых производных фуллерена C<sub>60</sub> проявляли выраженную способность ингибировать процесс ПОЛ. При этом наиболее эффективными ингибиторами этого процесса оказались калиевая соль фуллеренилпента-N-аминоянтарной кислоты и калиевая соль фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина.

Цель следующего этапа работы заключалась в исследовании влияния производных фуллерена C<sub>60</sub> на процесс неферментативного гликирования бычьего сывороточного альбумина *in vitro*. Оценивалось изменение специфической флуоресценции (регистрируемой при  $\lambda_{ex} = 370$  нм,  $\lambda_{max/em.} = 440$  нм, [Chen, Y.F. et al., J. Med. Plants Res. 2011]) конечных продуктов гликирования альбумина при добавлении производных фуллерена C<sub>60</sub>. Было обнаружено, что в присутствии всех исследованных производных фуллерена C<sub>60</sub> наблюдалось снижение интенсивности вышеуказанной специфической флуоресценции. Было сделано предположение, что в присутствии производных фуллерена C<sub>60</sub> происходит ингибирование процесса гликирования белка. Это приводило к уменьшению количества конечных продуктов гликирования альбумина, что, в свою очередь, приводило к снижению интенсивности сигнала наблюдаемой флуоресценции. Калиевая соль фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина проявляла наиболее выраженную антигликирующую активность *in vitro*.

Заслуживающим внимания результатом этой части работы являются данные об исследовании влияния производных фуллерена C<sub>60</sub> на каталитическую активность ферментов (альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы) полиольного пути метаболизма глюкозы *in vitro*. Было обнаружено, что три из шести исследуемых соединений проявляли

ингибирующее действие на каталитическую активность сорбитолдегидрогеназы, и четыре из шести исследуемых веществ ингибировали каталитическую активность альдозоредуктазы. При этом наибольшую ингибирующую способность проявляла калиевая соль фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина.

По результатам *in vitro* исследований было выбрано соединение (калиевая соль фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина), которое наиболее эффективно действовало *in vitro* на экспериментальные мишени сахарного диабета 2 типа. Это производное было выбрано для проведения *in vivo* экспериментов при моделировании вышеуказанного заболевания на крысах. В частности, исследовали влияние калиевой соли фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина на уровень глюкозы в крови крыс с экспериментальной моделью сахарного диабета 2 типа (вызываемого сочетанием диеты с высоким содержанием жиров и инъекцией стрептозотоцина). Обнаружено, что у крыс экспериментальной группы, получавших внутривентральные инъекции калиевой соли фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина, содержание глюкозы в крови было значительно меньше, чем в крови у модельных крыс, не получавших инъекции вышеуказанного производного фуллерена C<sub>60</sub>. На основании полученных данных сделан вывод об антигипергликемическом действии калиевой соли фуллеренилпента-N-3-гидрокси-L-тирозина.

Представленные результаты получены впервые, они имеют как фундаментальное, так и прикладное значение и открывают перспективы для будущих исследований. Результаты исследования вселяют надежду на возможность создания лекарственных препаратов на основе фуллеренов, позволяющих снижать негативные проявления при развитии сахарного диабета или других заболеваний.

#### О выводах

По материалам работы диссертант сформулировал 5 выводов, которые обоснованы и соответствуют поставленным задачам и полученным результатам. Следует только отметить, что сформулированные как «выводы», они скорее описывают основные результаты диссертации.

#### Личный вклад автора

Результаты, представленные в диссертации, получены непосредственно автором или при его участии. Эксперименты на крысах проведены совместно с к.б.н. Д.А. Арешидзе и сотрудниками лаборатории НОЦ МГОУ. Постановка задач и обсуждение полученных результатов проводились совместно с научным руководителем Р.А. Котельниковой.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации. Полученные результаты доложены на международных и российских конференциях и опубликованы в

трёх журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК. Получен один патент на изобретение.

К работе имеется ряд вопросов дискуссионного характера:

- Известно, что даже водорастворимые производные фуллерена  $C_{60}$  агрегируют, т.е., формируют комплексы, а не находятся в молекулярном виде. Агрегаты, несомненно, будут приводить к уменьшению возможного терапевтического эффекта фуллеренов. Нужно ли бороться с этой агрегацией и если да, то какими способами?

- Почему не проводилось исследование агрегационной способности используемых в работе фуллеренов (например, с помощью электронной микроскопии или методом динамического светорассеяния)?

- В литобзоре (стр. 14) указано, что водорастворимые фуллерены могут проходить через гематоэнцефалический барьер у крыс и оказывать нейропротекторное и противоопухолевое действие. А показано ли негативное влияние фуллеренов, в том числе и водорастворимых производных  $C_{60}$ ?

- В литобзоре (стр. 27) указано, что такие антиоксиданты как никотинамид, тиоктацид (препарат альфа-липоевой кислоты), витамины Е и С могут снижать содержание продуктов перекисного окисления липидов, повышать активность ферментов антиоксидантной защиты, положительно влияя на протекание сосудистых осложнений диабета, что улучшает качество жизни больных диабетом, отдаляя время инвалидизации и снижая летальность. В связи с этим, возникает вопрос: зачем исследовать фуллерены в качестве потенциального лекарственного средства, если уже есть, так скажем, более естественные вещества, снижающие негативные проявления сахарного диабета и улучшающие качество жизни пациентов?

- Почему в качестве объекта гликирования был выбран бычий сывороточный альбумин, а не традиционно используемые гемоглобин и фруктозамин?

Работа не лишена недостатков. В частности, на мой взгляд, одним из недостатков является то, что исследования проведены не на генетических моделях сахарного диабета у животных. Имеются и технические ошибки: в тексте работы не процитированы ссылки: 209, 210, 229; на рисунке 2.2. (стр. 51) по оси «у» неправильно указана единица измерения интенсивности хемилюминесценции – мВ, по-видимому, измерялось количество импульсов на единицу времени; при описании определения активности сорбитолдегидрогеназы в сыворотке крови (раздел 2.9) не указано кровь какого животного (или человека) была использована; на стр. 88 имеется упоминание на ссылку 246, хотя в списке литературы этой ссылки нет; на странице 6 два раза подряд написано слово «свойства»; на странице 28 ошибка в слове «карбинильными»; на странице 30 указан

фактор-jB, скорее всего это описка и имелся в виду NF-kB; в списке сокращений указаны два сокращения (СД1 и ТГ), которые не используются в тексте.

Более подробно, на мой взгляд, можно было бы описать в работе перспективы дальнейших исследований, а также порассуждать о возможном влиянии тех или иных фуллеренов на механизмы развития сахарного диабета или других заболеваний.

Сделанные замечания и заданные вопросы не являются принципиальными, а носят дискуссионный характер и не снижают высокой оценки представленной диссертации.

#### Заключение

Диссертационная работа Солдатовой Юлии Валериевны «Физико-химические механизмы действия водорастворимых пентааминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub> на экспериментальные мишени сахарного диабета 2 типа» является завершённой в рамках поставленных задач научно-квалификационной работой, имеющей научное и практическое значение. Диссертация Солдатовой Ю.В. соответствует всем требованиям Положения о присуждении ученых степеней ВАК РФ, а её автор, Солдатова Юлия Валериевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. «Биофизика».

И.о. директора Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки

Института теоретической и экспериментальной биофизики

Российской академии наук, доктор биологических наук

(специальность «Биофизика»)

Иван Милентьевич Вихлянцев

08.09.2021

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

142290, г. Пущино Московской обл., ул. Институтская, 3

Тел. 8(4967) 739-334, +7 925 2874090.

E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

«Подпись И.М. Вихлянцева» удостоверяю

Ученый секретарь ФГБУН ИТЭБ РАН

к.б.н.



Т.А. Перевязова

08.09.2021

## Сведения об оппоненте

### **Вихлянцев Иван Миленьевич**

*Ученая степень, звание:* Доктор биологических наук (специальность 03.01.02 – биофизика)

*Место работы:* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экспериментальной и теоретической биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), лаборатория структуры и функции мышечных белков.

*Должность:* И.О. директора; главный научный сотрудник лаборатории

*Адрес организации:* 142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

*Адрес эл. почты организации:* office@iteb.ru

*Телефон:* (495) 632-78-69

*Факс:* (4967) 33-05-53

*Сайт организации:* <https://iteb.ru>

**Научные публикации оппонента** по тематике диссертационного исследования Солдатовой Ю.В. за последние пять лет (2017-2021 гг.):

1. Шенкман Б.С., Цатурян А.К., Вихлянцев И.М., Козловская И.Б., Григорьев А.И. Молекулярные механизмы изменения мышечного тонуса в условиях космического полета и при его моделировании. // Acta Naturae. 2021. Т. 13. № 2. С. 85-97.
2. Лакомкин В.Л., Абрамов А.А., Студнева И.М., Уланова А.Д., Вихлянцев И.М., Просвирнин А.В., Лукошкова Е.В., Капелько В.И. Ранние изменения энергетического метаболизма, изоформного состава и уровня фосфорилирования титина при диастолической дисфункции. // Кардиология. 2020. Т. 60. № 2. С. 4-9.
3. Уланова А.Д., Грицына Ю.В., Бобылёв А.Г., Якупова Э.И., Жалимов В.К., Белова С.П., Мочалова Е.П., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С., Вихлянцев И.М. Ингибирование гистондеацетилазы-1 предотвращает снижение содержания титина (коннектина) и развитие атрофии в М. Soleus крысы после трёхсуточной гравитационной разгрузки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 169. № 4. С. 431-438.
4. Бобылёв А.Г., Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Галзитская О.В., Никулин А.Д., Шумейко С.А., Юршенас Д.А., Вихлянцев И.М. Изменения структуры титина при его агрегации. // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 4. С. 643-652.
5. Грицына Ю.В., Уланова А.Д., Попова С.С., Бобылёв А.Г., Жалимов В.К., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С., Вихлянцев И.М. Ингибирование гистондеацетилаз 4 и 5 уменьшает протеолиз титина и предотвращает снижение уровня экспрессии гена TTN при развитии атрофии в М. Soleus крысы после семисуточной гравитационной разгрузки. // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 495. № 1. С. 653-657.

6. BobylevA.G., KraevayaO.A., BobylevaL.G., KhakinaE.A., FadeevR.S., ZhilenkovA.V., MishchenkoD.V., PenkovN.V., TeplovI.Y., YakupovaE.I., VikhlyantsevI.M., TroshinP.A. Anti-amyloid activities of three different types of water-soluble fullerene derivatives // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019. V. 183. P. 110426.
7. Кулагина Т. П., Грицына Ю. В., Ариповский А. В., Жалимов В. К., Вихлянцев И. М. Содержание жирных кислот в поперечно-полосатых мышцах хронически-алкоголизированных крыс //Биофизика. 2018. Т. 63. №. 5. С. 1004-1013.
8. Грицына Ю.В., Салмов Н.Н., Бобылёв А.Г., Фадеева И.С., Фесенко Н.И., Садикова Д.Г., Кукушкин Н.И., Подлубная З.А., Вихлянцев И.М. Хроническая алкогольная интоксикация не сопровождается увеличением протеолитической активности кальпаинов в сердечной мышце крыс. // Биохимия. 2017. Т. 82. № 2. С. 280-289.
9. Попова С.С., Вихлянцев И.М., Захарова Н.М., Подлубная З.А., Фесенко Е.Е. Сезонные изменения протеолитической активности кальпаинов в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus*. // Доклады Академии наук. 2017. Т. 472. № 4. С. 487-490.