

ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертационной работе **Шипуновой Виктории Олеговны**
на тему «Многофункциональные надмолекулярные комплексы для
контролируемого воздействия на клетки *in vitro* и *in vivo*»,
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

В последние годы предложен ряд новых методических решений, обеспечивающих направленное воздействие на внутриклеточные процессы, намного более эффективное, чем при простом *in vitro* или *in vivo* воздействии биологически активного соединения. Концепция направленного транспорта позволяет строго локализовать воздействие, что позволяет уменьшить дозировку препарата и снизить его потенциальные негативные эффекты. Активно развивается концепция тераностики, совмещающая выявление пораженных патологическим процессом клеток и воздействие на них. Новые разработки в области нанотехнологий существенно расширяют ряд носителей, используемых для транспортировки биорегуляторов в организме, позволяют управлять специфичностью и динамикой терапевтических воздействий. Наконец, исследования в области молекулярных логических машин формируют основу для модулируемой активации фармацевтических препаратов, обоснованного выбора наиболее эффективной терапии с учетом комплекса взаимозависимых факторов. В связи с этим несомненна актуальность диссертационной работы В.О. Шипуновой, посвященной созданию и характеристике новых видов мультикомпонентных комплексов на основе наночастиц, селективно и модулируемо влияющих на клеточные процессы.

Подготовленная диссертация отражает успешное достижение поставленной цели, разработку новых подходов и подтверждение их эффективности.

Диссертационная работа В.О. Шипуновой построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов,

списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа изложена на 121 странице, содержит 52 рисунка и 12 таблиц. В библиографии диссертации представлено 203 источника.

Во вводной части диссертации кратко описываются возможности наночастиц как компонентов мультифункциональных препаратов медицинского назначения, характеризуется современное состояние работ в этой области и обосновывается постановка цели и задач исследования. Дается оценка полученных диссертантом результатов, их научной новизны и практической значимости, приводятся сведения об апробации работы.

В обзоре литературы рассматриваются все понятия, значимые для интерпретации результатов исследования; на основании анализа ранее полученных результатов обосновывается выбор подходов, наиболее перспективных для диссертационной работы. Обсуждаются основные классы наночастиц, используемых в биомедицинских разработках. Обосновываются преимущества применения наночастиц как агентов для терапии и диагностики заболеваний. Детально характеризуются биомедицинские задачи, решаемые в *in vitro* и *in vivo* системах с использованием магнитных наночастиц. Рассматриваются методы функционализации наночастиц и возможности антител как средств направленной доставки терапевтических препаратов. Описываются основные группы методов, применяемых для детекции связывания наночастиц с клетками.

Анализ литературы проведен В.О. Шипуновой на высоком уровне и дает адекватное представление о современном состоянии дел по проблематике работы. Рассмотрено значительное число публикаций, включая результаты исследований последних лет. Материал хорошо структурирован и четко изложен, охарактеризованные понятия и концепции формируют эффективный инструментарий для дальнейшего обсуждения результатов диссертационной работы. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации В.О. Шипуновой в области молекулярной биологии и смежных научных дисциплин.

В разделе «Материалы и методы» представлен научно-методический инструментарий, использованный диссертантом при проведении исследования.

Применявшиеся в работе методы включали синтез наночастиц оксида железа и их поверхностную модификацию, синтез золотых наночастиц, получение конъюгатов белковых носителей с гаптенами и с флуоресцентной меткой, характеристику получаемых межмолекулярных конъюгатов, культивирование эукариотических клеточных линий, МТТ-тест, иммуноферментный анализ, иммунохроматографию, регистрацию магнитных частиц с использованием МРQ-сенсора, проточную цитометрию, флуоресцентную спектроскопию и др. Данный ряд методов полностью соответствует задачам, которые решает соискатель, и позволяет провести комплексную характеристику разрабатываемых мультикомпонентных реагентов. Подробное описание использованных методов обеспечивает однозначную интерпретацию результатов исследований. В целом раздел «Материалы и методы» отражает высокую экспериментальную квалификацию В.О. Шипуновой в области молекулярной биологии.

Раздел «Результаты и обсуждение» подтверждает успешное решение диссертантом всех поставленных задач. Разработано несколько видов межмолекулярных конструкций для селективного мечения и количественного анализа клеточных маркеров. Показана регуляция состояния данных конструкций посредством взаимодействия с селективными лигандами, благодаря которой предложенные межмолекулярные комплексы функционируют в качестве элементарных биокомпьютерных устройств. Данные устройства, реализуя логические операции (полный набор булевых функций) в ответ на присутствие в среде соответствующих лигандов, обеспечивают эффективный транспорт реагентов и их локализованное действие на биологические процессы.

Значение полученных результатов для фундаментальных исследований состоит прежде всего в предложенном и экспериментально охарактеризованном подходе к реализации биокомпьютинга на основании одновременно осуществляемых лиганд-рецепторных взаимодействий на поверхности наночастиц. Данный инструментарий может быть использован при создании наноструктурированных зондов, характеризующих протекание различных метаболических процессов на клеточном и субклеточном уровнях. Помимо этого, в рамках работы детально охарактеризованы возможности предложенных

межмолекулярных конструкций для реализации лектин-углеводного распознавания, являющегося перспективным средством селективного транспорта функционализированных реагентов в *in vitro* и *in vivo* системах.

Практическое значение исследования В.О. Шипуновой определяется прежде всего применением разработанных конструкций для направленного транспорта реагентов в организме. Показана эффективность метода МРQ-цитометрии для характеристики различных воздействий на клетки. Предложен эффективный подход для изучения динамики функционализированных магнитных наночастиц в организме. Не вызывает сомнения значение предложенных средств биокompьютинга для управления препаратами на основе функционализированных наночастиц. Тем самым разработки В.О. Шипуновой могут быть успешно применены при реализации широкого ряда проектов биомедицинской направленности.

При характеристике полученных реагентов, оценке их функциональных свойств и биологического действия диссертант использует корректно выбранные методические решения, позволяющие делать однозначные выводы. Проведенные исследования сопровождаются необходимым комплексом контрольных экспериментов. Статистическая обработка получаемых количественных данных обеспечивает доказательность заключений. Формулируемые выводы обоснованы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования. Таким образом, обоснованность и достоверность сформулированных в диссертации положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнения.

В.О. Шипуновой проведено исследование, соответствующее уровню наиболее успешных современных биоаналитических, диагностических и тераностических разработок. Реализованная возможность управления функционализированными наночастицами посредством присутствия в среде селективно связываемых лигандов является уникальным решением, значимость которого для научного сообщества подтверждена, в том числе, публикацией результатов исследования в журнале *Nature Nanotechnology*. Диссертационная работа В.О. Шипуновой является полностью оригинальным исследованием,

удовлетворяющим всем требованиям ВАК РФ по новизне представляемых результатов, их значимости для науки и производства.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Убедительно показанные в работе преимущества МРQ-цитометрии по сравнению с проточной цитометрией основаны на сочетании применения магнитных наночастиц в качестве средств сепарации и генераторов детектируемого сигнала. Однако в диссертации не обсуждается сравнение эффективности детекции магнитных и различных оптических (в т.ч. флуоресцентных) маркеров в терминах предела обнаружения, воспроизводимости. Соответственно остается непрокомментированной возможность применения тройных комплексов магнитная наночастица – флуорофор – рецептор и сочетания магнитной сепарации с последующей оптической детекцией.

2. Обсуждение корреляции данных, получаемых методами МРQ-цитометрии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии (см. рис. 31 диссертации), было бы полезно сопроводить количественной оценкой – величинами коэффициентов корреляции, характеризующих измерения для исследованной выборки клеточных линий.

3. Интерес к использованию лектин-углеводного взаимодействия как средства направленной доставки препаратов в организме авторы обосновывают отличиями раковых клеток от нормальных по профилю гликозилирования. Однако достаточно ли этих отличий для эффективной локализации предлагаемых препаратов преимущественно в опухолевых тканях, или основная их масса окажется распределена по другим органам и тканям? Соответствующие оценки и анализ опыта предшественников были бы полезны при обсуждении этого направления исследований.

4. В диссертации отсутствует развернутое обсуждение экспериментов по выбору оптимальных условий сорбции гликопротеинов на поверхности золотых частиц. Иммуно(лектино)хроматографическая оценка реакционной способности получаемых препаратов дается лишь при последующей характеристике селективности. В то же время известно, что цитируемая в работе (стр. 80)

методика Германсона обеспечивает максимальное насыщение поверхности наночастицы сорбируемым белком, не всегда совпадающее с максимальной реакционной способностью получаемого препарата. Представляло бы интерес также сопоставить характеристику селективности полученных конъюгатов методом иммуно(лектино)хроматографии и литературные данные о соответствующих лектин-углеводных взаимодействиях. Тем самым можно будет оценить, не происходит ли при иммобилизации в каких-то случаях утрата реакционной способности и не требуется ли для этих случаев изменение условий иммобилизации.

5. Предлагая алгоритм обработки сигналов логическими операторами, диссертант пишет: «Для каждой операции порог “ИСТИНА-ЛОЖЬ” задан как среднее геометрическое между максимальным и минимальным выходным сигналом (точнее, среднего соответствующих значений) для клеток Jurkat» (стр. 92 диссертации). Предложенный критерий представляется приемлемым, однако его оптимальность требует дополнительного обоснования.

Вышеизложенные соображения носят частный характер, не снижают общую положительную оценку работы и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

Содержание работы в полной мере соответствует специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Результаты диссертационной работы представлены научному сообществу на одиннадцати российских и международных конференциях (12 опубликованных тезисов докладов). Основные положения и выводы работы опубликованы в четырех статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ, – «Доклады Академии наук» (2 статьи), «Nature Nanotechnology» и «Nanoscale». В виде статей и докладов представлены все результаты диссертации. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты исследования.

Диссертация В.О. Шипуновой «Многофункциональные надмолекулярные комплексы для контролируемого воздействия на клетки *in vitro* и *in vivo*» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной

работой высокого теоретического и экспериментального уровня. В.О. Шипуновой выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития молекулярной биологии – предложены и охарактеризованы новые виды многокомпонентных комплексов на основе наночастиц, предназначенных для селективного связывания с мишенями по поверхности клеток и модулируемого воздействия на функционирование клеток.

Диссертационная работа Виктории Олеговны Шипуновой соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении учёных степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии
Института биохимии имени А.Н. Баха,
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

к.б.н. Жердев А.В.

«27» февраля 2017 г.

119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Тел. (495)-9542804. E-mail: zherdev@inbi.ras.ru

«Подпись к.б.н. Жердева А.В. удостоверяю»



Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

к.б.н. Орловский А.Ф.