



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

194021, С.-Петербург, ул. Хлопина, 8, корп. 3, лит. А

Телефон (факс): (812) 448-69-80

www.spbau.ru

ОКПО 59503334, ОГРН 1027802511879

ИНН/КПП 7804161723/780401001

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по учебной работе,  
Руководитель Центра высшего образования  
федерального государственного бюджетного  
учреждения высшего образования и науки  
«Санкт-Петербургский национальный исследовательский  
Академический университет Российской академии наук»  
д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

А.Е. Жуков

«07» февраля 2017 года



### Отзыв ведущей организации

на диссертационную работу 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

### Актуальность темы диссертации

Использование наночастиц и комплексов на их основе представляется исключительно перспективным для задач современной биологии и медицины. Стоит отметить, что уже более 50 лекарственных препаратов на основе наночастиц допущено для терапии и диагностики заболеваний человека. Важным свойством наноструктур является не только их особая природа с проявлением квантовых размерных эффектов, не присущих массивным образцам, но и возможность модификации их поверхности набором биологически активных соединений с заданными характеристиками, например, биомолекулами, связывающимися с определёнными рецепторами клеток-мишеней. Данные свойства делают возможным реализацию адресной доставки соединений с использованием наночастиц, которая позволяет уменьшить системную токсичность веществ, улучшить их фармакокинетические параметры и увеличить терапевтический индекс

препарата. Однако при использовании наночастиц при нацеливании на клетки-мишени возникает проблема селективности данного нацеливания. Как правило, неизвестны абсолютно специфичные определённому заболеванию маркёры и требуется анализировать гораздо бóльший массив биохимической информации организма: растворимых соединений в биологических жидкостях, рецепторов на поверхности клеток, внутриклеточных соединений. Именно разработка новых подходов к созданию адресных агентов на основе наночастиц, селективно воздействующих на клетки-мишени, а также методов их детекции, является темой рецензируемой работы Шипуновой В.О. Диссертационная работа Шипуновой В.О. посвящена получению и всестороннему исследованию комплексов на основе магнитных нано- и микрочастиц, контролируемо воздействующих на клетки-мишени как *in vitro*, так и *in vivo*. Актуальность работы и её научная новизна не вызывает сомнений.

### **Структура, объём и содержание диссертации**

Диссертация объёмом 121 страница написана по общепринятому плану. Она состоит из введения, обзора литературы, раздела, посвящённого материалам и методам исследования, главы, объединяющей описание полученных результатов с их обсуждением, выводов, благодарностей, списка сокращений, библиографии, насчитывающей 203 ссылки и приложения с основными понятиями булевой алгебры, использованными в работе. Работа иллюстрирована 52 рисунками и содержит 12 таблиц.

В разделе «Введение» обоснована актуальность выбранной темы и сформулированы цели и задачи исследования, а также отражены научная новизна и практическая значимость работы.

Обзор литературы написан чётким и ясным языком, содержит пять глав. Обзор начинается с описания широкого разнообразия наночастиц различной природы и их уникальных свойств, позволяющих эффективно использовать наночастицы для задач биологии и биомедицины. Особое внимание уделено магнитным нано- и микрочастицам, их отличительным особенностям, а также разнообразным применениям *in vitro* и *in vivo*. Наиболее детально обсуждается адресная доставка соединений с использованием наноструктур в качестве носителей. Подробно описаны способы достижения многофункциональности наночастиц и придания им требуемых свойств за счёт поверхностной модификации направляющими соединениями. Отдельной главой описаны используемые на сегодняшний день методы детекции наночастиц при изучении их взаимодействия с клетками эукариот и описаны основные проблемы, существующие в этой области. Обзор охватывает широкий спектр

публикаций последних лет и даёт подробное представление о предмете исследования и позволяет оценить важность и актуальность выбранного направления работы.

В следующем разделе описаны использованные в работе материалы и методы. В разделе представлены все используемые реактивы, оборудование, биологические объекты, а также подробно описаны составы всех растворов. Из представленного описания материалов и методов очевидно, что Шипунова В.О. является зрелым специалистом, владеющим большим спектром современных методик, включающих, например, работу с эукариотическими клетками, лабораторными животными, методы синтеза наночастиц и их конъюгации с биомолекулами. Несмотря на разнообразие методов, диссертанту удалось кратко и понятно все их описать. Глава содержит все подробности, позволяющие при необходимости воспроизвести все проведённые эксперименты.

Раздел «Результаты и обсуждение» чётко соотносится с поставленной целью и задачами исследования.

**Научная новизна** работы определяется следующими результатами.

Во-первых, автором был разработан принципиально новый высокочувствительный метод детекции наночастиц, взаимодействующих с эукариотическими клетками-мишенями (MPQ-цитометрия), использующий собственные свойства частиц для их детекции без необходимости введения меток. Результаты, полученные в ходе данной работы, убедительно свидетельствуют о том, что разработанный метод действительно эффективен для количественной детекции как адресных наночастиц, так и неселективно связывающихся с поверхностью клеток-мишеней. Так, например, автором были получены и всесторонне исследованы наночастицы оксида железа с полноразмерными антителами с уникально высокой селективностью (130:1) связывающие онкомаркёр HER2/neu. Такая селективность полученных частиц вместе с разработанным методом позволила проводить количественную детекцию уровня экспрессии HER2/neu на поверхности клеток различных линий и детектировать HER2/neu-положительные клетки в смеси с другими.

Во-вторых, наряду с данными наночастицами были получены наноконструкции направленного действия с использованием мини-антител и лектинов в качестве направляющих агентов для нацеливания на клетки эукариот. Было показано, что данные комплексы могут быть использованы для идентификации клеточных линий – как по количественному магнитному сигналу, так и визуально с помощью флуоресцентной микроскопии.

В-третьих, важным результатом данной работы является разработка биокomпьютерных комплексов на основе наночастиц для контролируемого воздействия на клетки эукариот. В работе было показано, что данные биокomпьютерные комплексы могут анализировать молекулярное окружение клеток-мишеней и связываться с клетками на основании выполнения логической операции, на которую они запрограммированы: например, связываться с клетками только в случае наличия определённого низкомолекулярного соединения в микроокружении клеток, если комплексы запрограммированы на функцию «ДА». Особенно стоит отметить, что эффективность работы таких структур была продемонстрирована не только на клеточной модели *in vitro* с использованием разработанного метода МРQ-цитометрии, но и впервые в цельной крови *ex vivo*, а также *in vivo* в кровотоке лабораторных мышей.

### **Научно-практическая значимость диссертации**

Разработанный метод МРQ-цитометрии нацелен на применение как в фундаментальных научных исследованиях, так и ориентирован на клиническую практику. Метод эффективно работает в оптически непрозрачных средах, не требует сложного оборудования и дорогих расходных материалов. В работе было показано, что данные, полученные с помощью данного метода, находятся в хорошем соответствии с данными других широко используемых методов, в частности, проточной цитометрии, таким образом, метод может служить альтернативой некоторым методам *in vitro* и *ex vivo* диагностики в случаях, когда использование дорогого и непортативного оборудования невозможно, например, в полевых условиях или в развивающихся странах.

Более того, ранее оставалось неясно в целом, возможно ли применение широкой и перспективной области молекулярного биокomпьютинга в организме млекопитающих. Полученные ранее системы, например, на основе ДНК, эффективно использовались *in vitro* для различных биосенсоров и в клеточных культурах. Единственным продемонстрированным применением *in vivo* была адресная доставка биороботов к клеткам гемолимфы насекомого, но не млекопитающего. Полученные результаты открывают широкие возможности для создания нового поколения лекарств, работающих по принципу «магической пули» в организме и для развития тераностики (одновременной терапии и диагностики заболеваний) в целом.

Методические подходы и результаты исследования, полученные в данной работе, могут быть использованы в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки – Институте молекулярной биологии

им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Институте цитологии Российской академии наук, в Федеральном исследовательском центре Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук и в ряде других учреждений образования и науки РФ, а также при обучении студентов биологических и биофизических специальностей.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования**

В целом про работу Шипуновой В.О. можно сказать, что она представляет собой хорошо продуманное научное исследование, выполненное на высоком научном уровне и открывающее дальнейшие перспективы в развитии нанобиотехнологии и тераностики. Все сформулированные в постановочной части работы задачи выполнены. Экспериментальная реализация работы и достоверность полученных результатов не вызывают сомнений. Описываемые эффекты корректно подтверждены соответствующими контрольными экспериментами.

Выводы диссертации сформулированы последовательно и чётко, соответствуют представленному экспериментальному материалу и поставленным в начале работы задачам.

Результаты работы опубликованы в четырёх статьях, рекомендованных ВАК, в том числе, в высокорейтинговом международном научном журнале Nature Nanotechnology, а также в 12 тезисных сообщениях, 4 из которых индексируются в РИНЦ.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертационной работы.

### **Замечания**

Работа в целом написана хорошим языком с небольшим количеством опечаток и стилистических погрешностей. При детальном ознакомлении с диссертацией возникает ряд вопросов и замечаний. Работа не лишена незначительных недостатков, касающихся, в основном, её оформления.

1. На рис. 40 диссертации (он же рис. 9 автореферата) логической функции, означающей логическое отрицание, соответствуют обозначения как «НЕТ», так и «НЕ».

2. Стоило бы завершить обзор литературы заключением, которое бы выявило основные направления работы в данной области.

3. Следовало бы прокомментировать, каким образом задавался порог «Истина-Ложь» на графиках, представляющих результаты экспериментов по реализации логических функций.

4. Некоторые термины диссертации приведены без должного пояснения. Например, следовало бы пояснить, что означает термин «нелинейные магнетики».

Приведённые замечания относятся в основном к форме изложения и представлению результатов. Отмеченные недостатки не снижают высокой научной ценности работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Шипуновой Виктории Олеговны по актуальности темы, объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является цельным законченным исследованием, представляющим безусловный интерес для современной молекулярной биологии и 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 ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а её автор, Шипунова В.О., несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории нанобиотехнологий Центра нанотехнологий федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет Российской академии наук» (протокол № 03/17 от 27 января 2017 года).

Заведующий лабораторией нанобиотехнологий  
федерального государственного бюджетного учреждения  
высшего образования и науки «Санкт-Петербургский  
национальный исследовательский Академический  
университет Российской академии наук»  
академик

М.В. Дубина

194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корп. 3, СПбАУ РАН  
Тел. (812) 534-5850  
E-mail: [dubina@spbau.ru](mailto:dubina@spbau.ru)