

## Отзыв официального оппонента

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 выполненной работы

Диссертационная работа Шипуновой В.О. посвящена созданию и всестороннему исследованию наноструктур, обладающих способностью контролируемого воздействия на клетки эукариот.

Значительное внимание исследователей самых различных областей естествознания привлекает изучение взаимодействия наночастиц с живыми клетками. Наночастицы представляют собой удобную платформу для адресной доставки лекарственных препаратов и открывают широкие возможности для создания «магической пули» – идеального агента для терапии заболеваний, который селективно поражает только очаг болезни, не имея при этом побочных эффектов. Данная диссертационная работа посвящена созданию таких агентов направленного действия на основе наночастиц для адресной доставки к злокачественным клеткам, а также описанию нового метода детекции наночастиц, связавшихся с клетками.

Необходимо привлечение новых средств для реализации концепции «магической пули» для адресного воздействия на биологические мишени. Как правило, для большинства патологических состояний неизвестны биологические маркёры, позволяющие с абсолютной достоверностью диагностировать заболевание. В силу этого существует необходимость разработки систем, анализирующих несколько параметров биохимической информации. Так, одним из подходов к созданию данных систем является разработка биороботов на основе биомолекул и наночастиц, которые способны осуществлять элементарные логические операции на основе анализа молекулярного микроокружения и выполнять заблаговременно запрограммированное действие на основе проведённых вычислений. Одной из задач данной работы являлась разработка таких биоконьютерных структур, воздействующих на клетки как *in vitro*, так и *in vivo*.

Такие структуры, обладающие возможностью приборной детекции, позволяющие анализировать набор биохимической информации и

действовать на основе данного анализа, представляют собой новые уникальные средства тераностики. Таким образом, цели и задачи, поставленные автором в данной работе, являются, безусловно, актуальными.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа Шипуновой В.О. изложена на 121 странице и построена по классической схеме. Во введении автор раскрывает актуальность проведённого исследования и подводит к постановке задачи. Обзор литературы состоит из пяти частей. В первой части описываются разнообразие и свойства органических и неорганических наночастиц в качестве перспективных объектов для биологии и медицины. Особое внимание уделено магнитным наночастицам и их специфичным свойствам. Далее рассматриваются различные аспекты применений магнитных нано- и микрочастиц в биологии и медицине *in vitro* и *in vivo*: от изучения механических свойств живых клеток в 1920х годах до контрастирования в магнитно-резонансной томографии на сегодняшний день. Отдельной главой рассматривается адресная доставка как одна из наиболее обширных областей применения наночастиц в настоящее время. Подробно описаны широко используемые методы модификации наночастиц биомолекулами. В заключительной части обзора детально описаны методы детекции наночастиц при исследовании их взаимодействий с живыми клетками и актуальные проблемы в этой области.

Раздел «Материалы и методы» подробно описывает использованные в работе реактивы, оборудование, методы и протоколы. Следует отметить широкий спектр задействованных в работе молекулярно-биологических и физико-химических методов, включающих в себя: работу с культурами клеток и лабораторными животными, химические методы конъюгации наночастиц, синтез наночастиц, иммунохроматографию, метод динамического и электрофоретического светорассеяния, проточную цитометрию и другие. Описание экспериментов подробны для их воспроизведения. Знакомство с методами работы позволяет сделать вывод, что все они адекватны решению поставленных задач, а работа выполнена на высоком экспериментальном и методическом уровне.

Раздел «Результаты и обсуждение» хорошо структурирован и разбит на большое количество глав и подглав, что значительно облегчает восприятие материала.

Безусловной заслугой диссертанта стоит считать разработку нового метода детекции наночастиц, связанных с клетками эукариот, на основе регистрации нелинейных магнетиков. Данный метод позволяет с высокой чувствительностью ( $0.33$  нг или  $6.5 \cdot 10^{-18}$  моль частиц в объёме  $30$  мкл) детектировать наночастицы в оптически непрозрачных средах вне зависимости от факторов, влияющих на оптические свойства образца. Для демонстрации эффективности данного метода были получены адресные магнитные наночастицы оксида железа, высоко селективно связывающие широко известный в клинической практике онкомаркёр HER2/neu. Избирательность связывания данных частиц с HER2/neu в данном исследовании сравнима с избирательностью индивидуальных антител, что выгодно отличается от имеющихся в литературе данных.

Более того, было показано, что данный разработанный метод вместе с полученными адресными частицами может быть использован для высокочувствительной селективной детекции клеток-мишеней в составе сложной смеси, а также для количественной оценки уровня экспрессии мембранных антигенов.

Наряду с полученными конъюгатами наночастиц с полноразмерными антителами для селективного мечения клеток, был получен и подробно исследован ряд наноструктур направленного действия на основе специфичных взаимодействий мини-антител и лектинов с соответствующими мишенями на поверхности клеток.

Наиболее ярким результатом данной работы является демонстрация возможности контролируемого воздействия на клетки эукариот наночастицами как результата логических вычислений. Данные вычисления проводятся наночастицами под воздействием низкомолекулярных соединений, являющимися входными сигналами, если проводить аналогию с двоичной логикой в электронике. Впервые было показано выполнение логических операций одного и двух переменных биокомпьютерными комплексами (на основе наночастиц и белкового интерфейса) *in vitro* – в культуре клеток, *ex vivo* – в цельной крови и *in vivo* – в млекопитающем под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови животного.

Работа подробно иллюстрирована, что значительно облегчает восприятие этого непростого материала, и содержит 52 рисунка и 12 таблиц.

## Научно-практическая значимость исследования

Особенно стоит отметить практическую значимость работы. Разработанный метод детекции наночастиц, связанных с клетками эукариот, – МРQ-цитометрия нацелен на применение как в фундаментальных исследованиях в нанобиотехнологии, молекулярной и клеточной биологии, так и в клинической практике. Метод МРQ-цитометрии применим для изучения различных процессов взаимодействий между наночастицами и клетками, такими как интернализация и деградация, а также специфичное и неспецифичное связывание для выбора оптимальных частиц для различных биомедицинских применений, таких как адресная доставка лекарств, мониторинг клеток, магнитоуправляемая инженерия тканей и ряда других. Также благодаря тому факту, что наряду с нано- и микрочастицами, магнитные метки могут быть включены и в другие биологические объекты, такие как белки, бактерии и вирусы, предложенный метод может быть использован для изучения взаимодействия данных наноразмерных объектов с клетками. Разработанный метод может быть также использован для диагностики различных мембраноассоциированных маркёров заболеваний и служить альтернативой некоторым методам *in vitro* и *ex vivo* диагностики (например, проточной цитометрии) в случаях, когда использование дорогого и громоздкого оборудования невозможно, например, в полевых условиях или в развивающихся странах.

Полученные биокомпьютерные структуры на основе наночастиц и белкового интерфейса позволяют анализировать одновременно несколько параметров биохимической информации и проводить логические операции *in vitro* и *in vivo* под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений. Одновременная мультипараметрическая обработка биохимических сигналов может быть использована для увеличения специфичности адресной доставки лекарств и, как следствие, для уменьшения системной токсичности препаратов. Показанная в работе возможность проведения логических операций *in vivo* непосредственно в организме млекопитающих открывает большие возможности для создания нового поколения лекарств, работающих по принципу “магической пули”, и развития тераностики в целом.

Таким образом, Шипуновой В.О. в своём исследовании удалось получить принципиально новые результаты, ориентированные на

применение в фундаментальных исследованиях и клинической практике. Несомненно, они имеют большую научную и практическую ценность.

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

Работа выполнена на высоком современном экспериментальном научном уровне с использованием широкого арсенала современных как физических методов, так и методов молекулярной и клеточной биологии. Достоверность и новизна представленных результатов не вызывает сомнений, а сделанные выводы вытекают непосредственно из результатов, полученных в работе, абсолютно логичны и полностью соответствуют поставленным в работе задачам.

Результаты диссертации являются содержанием статей, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе в высокорейтинговом международном научном журнале *Nature Nanotechnology*, и 12ти тезисных сообщений, представленных на 11ти российских и международных конференциях.

При знакомстве с представленным экспериментальным материалом возникает ряд вопросов и замечаний, касающихся, в основном, оформления работы.

1. В списке литературы практически отсутствуют ссылки на отечественные источники.

2. В работе отсутствует раздел «Заключение», в котором следовало бы более подробно обсудить выводы и подвести итоги данного исследования.

3. Отсутствуют данные о характеристике золотых и ферригидритных наночастиц, использованных в работе.

4. Не во всех подписях графиков указано, что представляют собой планки погрешностей.

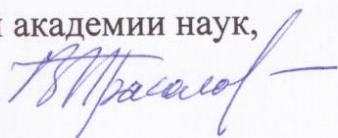
5. В тексте работы не объяснено, почему забор крови мыши для анализа проточной цитометрией осуществлялся через 8 минут после инъекции биокомпьютерных структур.

Следует отметить, однако, что данные замечания не являются принципиальными и нисколько не снижают ценности данной диссертационной работы. Автореферат работы полностью отражает содержание выполненной диссертации.

## Заключение

Диссертационная работа Шипуновой Виктории Олеговны 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 сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Главный научный сотрудник  
лаборатории клеточных основ развития  
злокачественных заболеваний  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук,



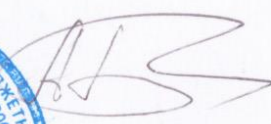
д.б.н., проф. Прасолов В.С.

119991, Москва, улица Вавилова, дом 32  
Тел. (499) 1359849  
E-mail: prassolov45@mail.ru

«Подпись д.б.н. Прасолова В.С. удостоверяю»

Ученый секретарь  
ФГБУН ИМБ РАН  
М.П.



 канд. ветеринар. наук Бочаров А.А.