

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)**

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01

27 ноября 2024 года

Защита диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Котельниковой Полины Александровны

Конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных белков

для онкотераностики

Специальность: 1.5.3. – Молекулярная биология

Москва, 2024 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 27 ноября 2024 года.

Председатель

диссертационного совета

акад., д.х.н. Анатолий Иванович Мирошников

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. Владимир Александрович Олейников

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
4.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
6.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
7.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
8.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
9.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
10.	Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.4.9)
11.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
12.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
13.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
14.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
15.	Д.б.н.	Рубцов Юрий Петрович	(1.5.3)
16.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
17.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
18.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)

Мирошников А.И., председатель: Уважаемые коллеги, начинаем заседание диссертационного совета. Защита Котельниковой Полины Александровны «Конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных белков для онкотераностики» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Научный руководитель – академик Деев Сергей Михайлович. Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ. Официальные оппоненты – Власов Валентин Викторович, академик РАН, профессор, научный руководитель Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, отсутствует по причине болезни; Алексей Радиевич Хомутов, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически-активных соединений Института молекулярной биологии им. Энгельгардта. Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук. Пожалуйста.

Олейников В.А., учёный секретарь: Материалы личного дела: Котельникова Полина Александровна, Российская Федерация, окончила Московский Физтех в 2018 году по направлению «Прикладные математика и физика», в 2022 году окончила аспирантуру ИБХ. С 2017 по 2020 год – инженер, с 2020 по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии нашего института. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология – отлично. Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии нашего института, ГНЦ ИБХ РАН. Научный руководитель, как уже было сказано, академик Деев Сергей Михайлович. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ в рецензируемых научных изданиях. Объявления о защите автореферата диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 27 сентября 2024 года. Все необходимые документы в деле имеются.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Вопросы к ученому секретарю? Нет? Пожалуйста, Полина Александровна.

Котельникова П.А., соискатель: *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, блестящий доклад! Пожалуйста, вопросы. Пожалуйста, Татьяна Владимировна.

Овчинникова Т.В.: Спасибо большое, Полина. Прекрасная работа! Поздравляю вас и вашего научного руководителя. Вопрос такой. Можно отдельно спросить? Очень

впечатляющий результат – это сочетанная терапия иммунотоксина и наночастиц. Вы сказали, что на 3 порядка эффективная концентрация уменьшается, а *in vivo* удалось это показать?

Котельникова П.А., соискатель: Да, у меня есть слайд для ответа оппоненту. *In vivo* комбинация препаратов тоже приводила к эффективной терапии. К сожалению, я не привела эти данные в докладе, потому что это работа коллег, Шипуновой Виктории Олеговны, работа на мышах. Здесь были ксенографные мышинные модели опухолей со сверхэкспрессией рецептора HER2. Мышам по очереди вводили в течение нескольких дней иммунотоксин и данные наночастицы PLGA, окруженные доксорубицином, направленные к HER2 рецептору при помощи аффибоди. И у мышей, которым вводили комбинацию препаратов, тоже достигалось наилучшее уменьшение размера опухоли.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы? Пожалуйста, Борис Борисович. Вас не слышно. Громко говорите.

Дзантиев Б.Б.: Будьте добры, вот вы сравнивали три белковых молекулы: антитело, дарпин, аффибоди. И, может, я не увидел на слайде, может, там были эти цифры. Вот корректное сравнение, когда вы понимаете, сколько молекул садится и сколько сохраняет активность. Вот, если вы сравниваете полноразмерное антитело, дарпин, аффибоди, то как вот эти количественные характеристики выглядят?

Котельникова П.А., соискатель: Да, на слайде действительно не приведены точные числа, но измеренное количество по полному количеству белка у трастузумаба связывание было наименее эффективным относительно двух этих малых молекул. При этом оценить специфичность данного действия мы могли только по связыванию с клетками. Связывание трастузумаба было сопоставимо со связыванием аффибоди (аффибоди связывалось в 1,5 раза лучше трастузумаба). При этом с дарпином, несмотря на то, что его с поверхностью наночастиц связалось столько же, сколько аффибоди, полная конструкция приводила к наименее эффективному связыванию. Мы предполагаем, что за счёт геометрических трудностей, потому что этот маленький белок на поверхности крупной наночастицы не мог достигнуть своей цели на HER2 рецепторе, своего адреса связывания.

Мирошников А.И., председатель: Еще вопросы? Не вижу вопросов. Спасибо. Можете отдохнуть. Сергей Михайлович, пожалуйста.

Деев С.М., научный руководитель: Очень приятно. Сегодня для меня праздник: Полина защищает диссертацию. Полина кончала Физтех, то есть это сложившийся физик. Вы слышали: по специальности математика и физика. И вот с таким бэкграундом человек, который нам всем расскажет про уравнение Шрёдингера гораздо больше, чем мы все вместе расскажем, она очень быстро и очень хорошо «биологизировалась». Наша лаборатория имеет прекрасные приборы, прекрасный опыт, клетки, и мы даем возможность каждому человеку проявиться в том, в чем ему хочется, и в том, что он может. И вот к своему прекрасному физическому образованию Полина очень быстро освоила все методы работы с клетками, работы с животными. В комнату к ней я всегда с интересом захожу, потому что там сидят разные мышки, крыски. И это на очень высоком профессиональном уровне. То есть в настоящее время Полина – сложившийся ученый, способный к самостоятельной работе, к постановке задач и решению их. По-моему, она уже заслужила вот эту квалификационную работу. Я полностью поддерживаю присуждение ей степени. Рад и благодарен ей, что она работает в нашей лаборатории. Спасибо!

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Пожалуйста.

Олейников В.А., учёный секретарь: Так, теперь отзывы. Во-первых, заключение организации, где выполнялась работа. Выполнялась она в нашем институте, Институте биоорганической химии. И заключение, соответственно, от нашего института *(зачитывает заключение организации, где выполнялась работа, заключение положительное)*.

Я повторю биографические данные: 2018 год магистратура окончена, с 2018 по 2022 аспирантура у нас. Научный руководитель, академик Сергей Михайлович Деев, только что выступил. Тема диссертационной работы утверждена нашим ученым советом 19 декабря 2018 года. Работа обсуждена на открытом межлабораторном семинаре отдела иммунологии ИБХ. И, соответственно, принято следующее заключение. Во-первых, актуальность исследования базируется на том, что борьба с раковыми заболеваниями очень актуальна. И шаг, который делается в результате этой работы, очень важен, очень актуален. Соответственно, личное участие: подчеркивается, что все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации лично выполнены соискателем или при его непосредственном участии под руководством Сергея Михайловича и Шипуновой Виктории Олеговны. Дальше результаты. Результаты здесь кратко и четко совершенно записаны и фактически совпадают с теми

выводами, которые мы только что видели. Степень достоверности не вызывает сомнений, так как исследования проведены с помощью современных подходов с использованием широкого спектра методов, связанных с клеточной [биологией], с проточной цитометрией, электронной и оптической микроскопией, динамическим светорассеянием и так далее. Далее, новизна практическая и научная значимость. Здесь подчеркивается, что впервые проведено сравнение ряда флуоресцентно меченных направляющих белков для адресной доставки, показаны эффективное накопление в опухоли и визуализация, а также фотосенсибилизирующий эффект. Далее, разработан новый способ стабилизации и направленной доставки к раковым клеткам наночастиц магнетита. Опубликовано все в девяти статьях и представлено на российских и международных конференциях. Проверка на оригинальность, отсутствие заимствований – все положительно, все выполнено правильно. Соответственно, в результате обсуждения на открытом межлабораторном семинаре отдела иммунологии, на котором присутствовали 15 человек (вот здесь надо исправить), 13 – за, против и [недействительных] нет. Подписано секретарем семинара Пахомовым и замдиректора Ямпольским. Заключение утверждено директором нашего института, академиком Александром Габитовичем Габитовым.

Ведущая организация (*зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный*).

Ведущая организация – Институт цитологии Российской академии наук. Разработка и исследование подходов для селективной доставки наноматериалов к клеткам опухолей определяют и актуальность, и научную новизну. Четко прописаны достижения и полученные результаты. Подчеркивается, что достоверность не вызывает сомнений. 9 статей. Научно-практическая значимость работы в том, что полученные знания могут быть использованы для создания эффективных адресных противораковых агентов, что позволит приблизить применение таргетных наночастиц и иммунотоксинов в клинике. Структура диссертации: введение, обзор литературы – в общем, классическая схема. Список используемой литературы – 166 наименований. Более подробно описано введение диссертации, обзор литературы, подробно описано применение направляющих белков неиммуноглобулиновой природы, в частности, дарпинов и аффибоды. Особое место в обзоре отведено наночастицам для онкотераностики и трудностям доставки наночастиц в опухоль. Материалы и методы описаны очень подробно. Результаты обсуждения: здесь перечислено по пунктам, то, что достигнуто

нашим диссертантом. И, соответственно, пишется, что диссертация производит положительное впечатление, однако при знакомстве с текстом возникает ряд вопросов и замечаний. Вот здесь я подробно прочитаю: первое, в диссертации предложен новый метод модификации наночастиц магнетита. Было бы интересно узнать, каким образом был выбран такой необычный объект, как пептид магнитотактических бактерий. За счет чего он связывает поверхность магнетита? Есть ли специфичность этого взаимодействия? Можно ли привести примеры других подобных белков, подтверждающие универсальность предложенного подхода? Второе, в работе продемонстрированы фотосенсибилизирующие свойства наночастиц серебра. Есть ли практический смысл в модификации поверхности и присоединения направляющих молекул для частиц, для которых рассматривается внутриопухолевое введение? Третье, диссертация написана доступным языком, хорошо проиллюстрирована, но есть некоторое количество недочетов, которые затрудняют восприятие материала. В тексте присутствует ряд опечаток, нарушение согласования слов, например, «инфракрасным», «наночастицам», «лигандам». Увеличение размера подписей на некоторых рисунках, например, на рисунке 27, 31 и других могло бы улучшить их читаемость. Приведенные замечания не снижают ценности работы и значимость полученных результатов. Работа Котельниковой Полины заслуживает положительной оценки за целостность и новизну научных результатов. Соответственно, диссертация отвечает всем критериям, в том числе пункту 9, установленным положением о присуждении ученых степеней, утвержденных (тут перечислены все постановления нужные правительству Российской Федерации), а автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории динамики внутриклеточных мембран отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта ИНЦ РАН и, соответственно, подписан: главным научным сотрудником, зав. отдела внутриклеточной сигнализации транспорта Корниловой и утвержден директором Института цитологии Российской Академии наук, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН Томилиным.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Полина Александровна, отвечайте.

Котельникова П.А., соискатель: Я начну с последнего вопроса. Да, к сожалению, в тексте присутствует несколько опечаток. При коррекции и сокращении некоторых предложений согласование слов в нескольких местах было упущено. Но, надеюсь, что в будущих работах я не буду совершать таких ошибок. Теперь перейдем к первому

вопросу про магнитотактические бактерии. Начнем с конца. Пептид, который связывает магнетит, в своем роде не единственный. Есть целый ряд пептидов: так называемые пептиды, связывающие твердую фазу, или белки, связывающие твердую фазу. Эти белки могут распознавать различные материалы, включая металлы, оксид кремния, графен и другие новые модные материалы для специфического связывания и проведения различных иммунологических тестов. Но пептид магнитотактических бактерий интересен тем, что он был взят из природы. Магнитотактические бактерии – это микроорганизмы, которые внутри себя могут строить магнитные наночастицы. Эти магнитные наночастицы интересны еще и тем, что это практически полноценная мембранная органелла, что для бактерий, как правило, несвойственно. В бактериях есть целый большой набор белков не просто для того, чтобы связывать железо или магнетит, а для того, чтобы выстроить эти мембранные органеллы, создать в них условия, благоприятные для синтеза и разрушительные для бактерии, изолировать бактерию от этих условий и внутри из железа, которое присутствует в окружающей среде, синтезировать и стабилизировать наночастицы. Причем форма этих наночастиц зависит от вида бактерии и связана с рядом белков. Белок Mms6 был обнаружен как белок, который отвечает как раз за стабилизацию этой наночастицы магнетита. В дальнейшем было обнаружено, что он состоит из двух доменов. Первый находится в мембране магнитосомы, а второй, с-концевой участок, отвечает за связывание с магнетитом. В нашей работе мы использовали только этот с-концевой участок. В работах коллег во всем мире, включая Японию, было обнаружено, какие именно аминокислоты отвечают за это связывание путем направленного внесения мутаций. Был обнаружен наиболее активный участок в этом белке [Mms6]. То есть такое связывание специфично и обусловлено структурой этого белка и связыванием определенных аминокислот с магнетитом. Также здесь не приведено на слайде, но существует ряд работ, где этот пептид использовали для синтеза магнитных наночастиц в клетках отличных от магнитотоксических бактерий, в других микроорганизмах, а также в человеческих клетках, например, в мезенхимальных [стволовых] клетках человека. То есть этот белок может специфично связывать магнетит и непосредственно участвовать в его синтезе в этих бактериях. Второй вопрос был связан с модификацией наночастиц серебра. Данная часть работы тоже не приведена в диссертации. Эта работа совместно с коллегами из нашей лаборатории, которую непосредственно проводила Виктория Шипунова со своей студенткой Марией Беловой (эту часть на мышах). Они также прививали мышам ортотопическую опухоль

со сверхэкспрессией рецептора HER2, вводили этим мышам полученные адресные наночастицы серебра и облучали светом резонансной длины волны. Важно отметить, что сами наночастицы серебра без облучения обладали некоторым противоопухолевым эффектом за счет того, что они со временем могут высвобождать токсичные ионы. При этом не было отмечено системной токсичности и влияния этих высвобождаемых ионов на внутренние органы мыши. При этом, когда мышь облучали светом параллельно с введением наночастиц, у мышей была достигнута полная ремиссия опухоли. Это важный результат. То есть действительно наночастицы серебра, с одной стороны, спорный объект, потому что у них есть собственная токсичность. Но эту собственную токсичность можно обратить во благо, саму ее используя для терапии. Поэтому не стоит снимать серебро со счетов. Второй момент: модификация поверхности наночастиц нужна не только для системного введения, она нужна не только для того, чтобы частицы закрепились, циркулируя в кровотоке. Есть ряд публикаций, посвященных исследованию того, как ведут себя наночастицы, когда их вводят непосредственно в опухоль. Если взять одни и те же наночастицы, синтезированные одновременно, с одним и тем же размером, формой, материалом, но покрыть их разными по заряду и свойствам полимерами, то при одинаковом методе введения эти частицы будут распределяться по-разному. Одни из них накопятся в месте введения и останутся там, где их ввела игла. Другие вытеснятся на периферию опухоли, а третьи распределятся по ней. Кроме этого, есть исследования, которые подтверждают, что адресная модификация поверхности может способствовать удержанию наночастиц в опухоли. Поэтому нам важно думать о том, что мы вводим животному или вводим пациенту, не только, когда это внутривенная инфузия. Еще стоит добавить, что в обзоре литературы отражено разнообразие наночастиц, которые применяются на людях. И в основном это действительно биосовместимые частицы, так называемые контейнеры: липосома или полимерный шарик, внутрь которого загружен препарат. Единственные наночастицы из неорганических материалов – это наночастицы оксида гафния, модифицированные золотой поверхностью. Эти частицы используют именно для внутриопухолевого введения. Они применяются в Европе и одобрены в Америке последние несколько лет для лечения рака головы и шеи и радиосенсибилизации. Их вводят непосредственно в опухоль, а затем рентгеновскими лучами эту опухоль облучают. Поэтому мы должны думать о модификации наночастиц, проводить нашу работу не только тогда, когда мы вводим эти частицы внутривенно. Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Владимир Александрович, отзывы на автореферат.

Олейников В.А., учёный секретарь: Да, поступило в совет два отзыва на реферат. Отзывы полностью положительные. Диссертация Котельниковой и ее публикации по теме работы свидетельствуют об успешном достижении поставленной цели, решении всех задач, что эта работа достойная. Ну и, соответственно, я зачитываю. Первый отзыв подписал ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологии Федерального государственного учреждения Федерального исследовательского центра «Фундаментальной основы биотехнологии» Российской академии наук Жердев Анатолий Витальевич. Второй тоже отзыв полностью положительный, подписан кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Корнеевым Кириллом Викторовичем.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Владимир Александрович, давайте теперь отзыв академика.

Олейников В.А., учёный секретарь: Нет, давайте сначала того, кто есть. Присутствующего. Расскажите? Хотите, чтобы я зачитал?

Мирошников А.И., председатель: Да, зачитайте. Все-таки по порядку.

Олейников В.А., учёный секретарь: Официальный оппонент Власов, академик РАН (*зачитывает отзыв официального оппонента, отзыв положительный*). Соответственно, отзыв, полностью положительный. Начинается с того, что [работа] посвящена важным вопросам разработки современных методов диагностики и терапии онкологических заболеваний с использованием наночастиц и рекомбинантных белков. Сфокусирована работа на создании универсальных и стабильных конструкций, способных избирательно воздействовать на раковые клетки, что представляет значительный интерес, поскольку в современной онкологии крайне востребованы новые подходы и решения для повышения специфичности и снижения токсичности существующих методов лечения. Структура диссертации, список литературы (166 наименований), 133 страницы. Стоит отметить, что обзор литературы посвящен не только фундаментальным исследованиям, но и клиническим испытаниям и практическому применению наночастиц и скафолдовых белков для терапии и диагностики опухоли. Использованные методы включают проточную цитометрию, динамическое и электрофоретическое светорассеяние, электронную микроскопию,

методы молекулярной и клеточной биологии. Методики описаны достаточно подробно, изложение эксперимента позволяет повторить проведенные исследования. Подходы адекватны поставленным целям и задачам. К числу наиболее значимых результатов диссертации относятся сравнение ряда направляющих белков для модификации наночастиц для адресной доставки к раковым клеткам, демонстрация синергического воздействия противораковых агентов различной природы, в том числе иммунотоксина и адресных наночастиц, направленных на различные участки рецептора HER2, и разработка модульного метода модификации наночастиц с использованием белковой пары «барназа-барстар». Достоинством данной работы является то, что полученные результаты могут быть использованы на практике при разработке таргетных противораковых препаратов. Однако при знакомстве с работой возник ряд следующих замечаний и вопросов, требующих уточнения. Первое. В работе утверждается синергетическое действие иммунотоксина и адресных наночастиц, нагруженных доксорубицином. Каким методом рассчитывали эффективность сочетанной терапии? Подтверждали ли вы повышение эффективности препаратов на клетках другими методами? Сохраняется ли эффект синергизма и на животных моделях? Второе. В работе описывается новый метод модификации наночастиц с использованием связывающего магнетит пептида и пары «барназа-барстар». Существуют ли примеры применения такого метода модификации для других типов наночастиц, где эффективность связывания наночастиц подтверждалась бы общепринятыми методами клеточной биологии? В чем преимущество сложной системы бактериальной рибонуклеазы и ее ингибитора перед такими классическими системами, как «биотин-стрептавидин»? Третье. На рисунке 16 диссертации приведены оптические томограммы мышей с исследуемыми наночастицами. Однако не приведены численные данные, показывающие эффективность такого контрастирования опухолей. Для чего получали снимки в двух различных режимах, а не только с использованием оптимальных длин волн для используемого красителя? Четвертое. Работа содержит некоторое количество опечаток, заимствований и англицизмов. Подписи на некоторых рисунках выполнены мелким шрифтом, что может затруднять восприятие материала. Данные замечания ни в коей мере не умаляют высокой научной значимости и практической ценности диссертационной работы, которая является полноценным научным исследованием, приближающим нас к решению одной из ключевых проблем диагностики и терапии опухолей. В целом работа Котельниковой заслуживает положительной оценки за новизну научных результатов. Задачи исследования

выполнены, опубликованные результаты и выводы соответствуют содержанию диссертации. По результатам работы опубликовано 9 статей в рецензируемых научных журналах, представлены доклады на ряде конференций как в России, так и за рубежом. На основании всего вышесказанного, можно заключить, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, в которой решена актуальная задача разработки высокоспецифичных и эффективных наночастиц для диагностики и терапии раковых заболеваний. Диссертационная работа Котельниковой отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациями, соответствует критериям, в том числе пункту 9, установленных положений о присуждении ученых степени (далее перечисляются постановления правительства). Соответственно, автор диссертации заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Официальный оппонент Валентин Викторович Власов, академик РАН. Соответственно, это Новосибирский институт.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо Полина Александровна, отвечайте.
Котельникова П.А., соискатель: Снова начну с последнего вопроса и принесу свои извинения за имеющиеся в тексте отпечатки. По поводу англицизмов: действительно существуют некоторые противоречия в терминологии, можно ли и правомерно ли использовать слова «функционализация», «модификация». Довольно часто мы используем выражения, сложившиеся в области нанотехнологий, которые вызывают реакцию у людей, которые занимаются другими биологическими и научными областями. Вернемся к остальным вопросам. Комбинированное действие мы оценивали методом Чоу-Талалая (Chou-Talalay). Была экспериментально измерена при различных концентрациях используемых препаратов часть ингибированных клеток, то есть тех клеток, которые погибли и тех, на которых этот препарат не оказал влияния. При помощи программного обеспечения были рассчитаны индексы: так называемый комбинаторный индекс и индекс снижения дозы. Эти индексы показывают, насколько синергичным является эффект, то есть снижаются ли необходимые концентрации препаратов при использовании их комбинации. Показали, что для клеток SK-BR-3, которые приведены сверху, наблюдается сильный синергизм. На эти клеток со сверхэкспрессией рецептора [HER2] эффективно воздействует DARP-loPE. Такой синергизм не наблюдается для клеток, у которых этого рецептора нет. Мы использовали, конечно, и другие методы, кроме МТТ-теста, для подтверждения эффективности данных противораковых препаратов на HER2 положительных клетках, например, клоногенный анализ (вместе с соавторами данного исследования). Показали,

что комбинация наночастиц PLGA, модифицированных аффибоди и доксорубицином, вместе с иммунотоксином (слева концентрация иммунотоксина, а справа три режима добавления наночастиц, либо их отсутствие) приводит к эффективному противоопухолевому действию и снижению количества клеток, обладающих пролиферативной активностью. И, как я уже говорила, коллеги, Шипунова Виктория Олеговна, Комедчикова Елена, в рамках этого исследования, в рамках этой публикации, показали, что и на мышах действительно эти два препарата с друг другом не конкурируют, их комбинация приводит к наиболее эффективному подавлению роста опухоли. Здесь черным цветом показан рост опухоли в контрольной группе, синим и зеленым, если это видно, воздействие одного препарата, и красным – размер опухоли при воздействии комбинации двух препаратов, который практически стремится к нулю. Следующий вопрос про использование белковой пары «барназа-барстар». Как я сказала, существует ряд пептидов и белков, которые могут связывать твердые поверхности, различные материалы. Есть ряд публикаций, посвященных модификации наночастиц из кремния, оксида кремния, карбона, различных металлов, таких как золото и серебро. Эти пептиды подбирают для специфичного связывания различными комбинаторными методами, либо методами рационального дизайна, когда пытаются предсказать пептиды, которые будут эффективно связываться, либо создают комбинаторные библиотеки, например, на базе фагового дисплея или бактериального дисплея, и из них отбирают наиболее эффективно связывающиеся пептиды. Белки слияния либо конъюгаты этих пептидов с различными активными молекулами, такими как противораковые препараты, антитела или флуоресцентные белки, могут создавать в комбинации эффективные наноагенты. Также в нашей лаборатории Виктория Олеговна Шипунова разработала метод для модификации наночастиц с оболочкой из оксида кремния и парой «барназа-барстар», где барстар был получен в составе комплекса с пептидом, связывающим силику. В данной работе использовалась не только магнитная цитометрия с использованием магнитометра, разработанного в Институте общей физики Никитиным, но и эти методы были валидированы классическими методами, такими как проточная цитометрия и другие методы, используемые в клеточной биологии. Про преимущество пары «барназа-барстар» я уже отметила, что эта пара имеет необычайно высокую аффинность друг к другу. При этом важным отличием «барназы-барстар» от «биотина-стрептоvidина» является то, что ни барназы, ни барстара в организме человека не присутствует, соответственно, они не будут конкурировать за связывание с какими-то другими молекулами. Так, «биотин-

стрептовидин» – это прекрасная структура для *in vitro* работ, но в организме биотин в каком-то количестве всегда присутствует, и за это связывание [стрептавидин] будет конкурировать с теми витаминами, которые в организме человека находятся. При этом еще одно важное преимущество: несмотря на то, что и барназа, и барстар – это белки для организма человека чужеродные, они не вызывают значительные иммунные реакции, а когда они объединены в комплекс, они еще и нетоксичны. Да, барназа – это рибонуклеаза, это токсин, но барстар полностью ингибирует ее активность, делая такой комплекс полностью биосовместимым. Существуют примеры не только модификации наночастиц, которые были разработаны в рамках данной диссертации и которые были получены коллегами, например, Викторией Олеговной Шипуновой, но и примеры модификации различных белковых молекул, флуоресцентных молекул для эффективного мечения раковых клеток. Также белковая пара «барназа-барстар» нашла свое применение в так называемом методе двухстадийной доставки, когда адресный модуль вместе с барназой сначала доставляется к раковым клеткам, а затем к ним с высокой аффинностью притягивается барстар вместе с терапевтическим агентом или наночастицей. Данный метод доказал свою эффективность в ряде работ нашей лаборатории и работ коллег, включая работы не только с наночастицами, но и с, например, CAR-T клетками. Вернемся к вопросу об оптической томографии. Здесь приведены две фотографии мышей: мыши с HER2-положительной опухолью и контрольной мыши, которым вводили наночастицы. Как положительный контроль – справа пробирки с наночастицами. Мы визуализировали их в двух каналах. Первый канал наиболее близок к спектру поглощения флуоресцентного красителя IR-780 (он по своему спектру близок к одобренному FDA индоциановому зеленому). Его флуоресценция находится в окне прозрачности биологических тканей. Действительно здесь опухоль светится примерно так же, как контрольная пробирка с частицами, и достигается значительная специфичность свечения опухоли не только относительно фона или относительно контрольной опухоли, но и относительно других органов мыши (здесь мы взяли среднюю яркость свечения мыши в районе печени). Во втором канале получается чуть меньшая яркость относительно контрольной пробирки с частицами, поскольку, возможно, данный свет не настолько оптимален для возбуждения IR-780. Но, как я уже сказала, в данных частицах было два красителя, IR-780 и Nile Blue, которые вместе давали более эффективную комбинацию для фототерапии. Кроме этого, Nile Blue – это биосовместимый краситель. Он не является фотосенсибилизатором, и его облучение напрямую не приводит к генерации активных

форм кислорода. Поэтому, облучая светом, который эффективно поглощается Nile Blue, мы можем детектировать сигнал в том же фильтре в окне биологической прозрачности, но при этом не достигаем терапевтического эффекта. То есть данное применение мы назовем диагностическим, а облучение при длинах волн, которые соответствуют фотосенсибилизатору IR-780, мы можем назвать терапевтическим. Избегая этого режима облучения, мы можем избежать воздействия на здоровые ткани, если мы смотрим не прицельно опухоль, а, например, сканируем организм целиком. Я надеюсь, я ответила на этот вопрос.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Следующий оппонент Алексей Радиевич Хомутов. Пожалуйста.

Хомутов А.Р., официальный оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный).*

Дорогие коллеги, мне очень приятно находиться в этом зале. Я хочу поблагодарить всех за приглашение прооппонировать замечательную диссертацию. Но, вы знаете, дело в том, что задача оказалась очень сложная, потому что по определению оппонента он должен найти недостатки и какие-то замечания и находиться в этих рамках и на этом поле. В общем, работа замечательная. Это видно было из доклада и из дискуссий, особенно из ответов на вопросы, когда стало совершенно ясно, что работа, которую мы сегодня заслушали, это есть лишь вершина айсберга. И Полина Александровна совершенно с удовольствием рассказывала нам о том, что находилось в подводной части. Что мне хотелось бы еще отметить, что автореферат написан кратко, хорошо структурирован, там нет лишней информации. И, вы знаете, это стиль такой – широкими мазками. Это, в общем, больше характерно для докторских диссертаций, конечно. И, наверное, вы находитесь на правильном пути, Полина Александровна. Теперь еще об автореферате. Хотел сказать: он читаем. И я думаю, что здесь, наверное, заслуга Сергея Михайловича, который вспомнил о старом советском ГОСТе, который запрещал печатать авторефераты мелкими цифрами и с маленькими интервалами. Теперь, собственно, о работе. Коротко о работе, потому что у работы очень хорошее название. Слово «онкотераностика» емкое, и я воспринимаю его как «найти и уничтожить». Но есть еще одна составляющая, потому что в онкотерапии очень важно еще и быстро и эффективно заменить малоэффективные лекарства. И вот совокупность этих двух обстоятельств – с одной стороны, найти и уничтожить, а с другой стороны, возможность корректировать терапию – представляет собой, конечно, архисложную задачу. И удивительно, что Полине Александровне под руководством Сергея

Михайловича удалось найти оригинальные подходы для решения этого, используя в качестве объекта клетки опухоли молочной железы, несущие HER2 рецептор. Для этого были использованы наноконструкции. Наноконструкции были сделаны на основе различных наночастиц: это были и биodeградируемые наночастицы, и частицы серебра, и магнетита. Были исследованы три направляющих белка. Чемпионом оказался здесь аффибоди. И эти наноконструкции были нагружены различными флуоресцентными красителями или доксорубицином. И здесь же опять существенным, на мой взгляд, является то, что были сделаны наноконструкции с использованием барстар-барназной системы. То есть отсутствие ковалентной связи позволяет менять противоопухолевый реагент, используя надлежащий конъюгат. И это архиважно, и мне кажется, это заслуживает всяческого внимания. И дальше, что получилось? Дальше, изменяя свойства или комбинируя свойства этих наночастиц и используя различные направляющие белки, Полине Александровне удалось провести фототермическую, фотодинамическую терапию на уровне клеток и успешно визуализировать опухоли на уровне мышей. Теперь, собственно, о диссертации. Диссертация построена по стандартной схеме. И я бы хотел остановиться здесь лишь на литобзоре, потому что очень часто литобзор представляет собой некую историю, в большей или меньшей степени приближенную, собственно, к теме диссертационной работы. Полина Александровна пошла по другому пути: литобзор четко совершенно структурирован и состоит из отдельных частей, каждая из которых посвящена составляющим наноконструкций. Это и описание наночастиц, и описание направляющих белков, и противоопухолевых препаратов. Это тяжелая на самом деле была задача, и она блестяще с ней справилась. Подобное построение литобзора, безусловно, облегчает восприятие результата и позволяет понять место этого исследования в мировом научном поле. Впечатляет еще и набор и разнообразие методов, которые были использованы в работе. Это действительно колоссальный набор. Что мне еще понравилось, во-первых, они хорошо описаны в литературе. Полина Александровна, естественно, работала с большой группой коллег внутри лаборатории и вне. Она совершенно честно говорит: «Вот это мы сделали совместно с этими товарищами, это совместно с этими. Но методы мы приводим, и их вы при желании сможете воспроизвести». В заключении я бы хотел сказать, что выводы работы обоснованы, соответствуют тем задачам, которые были поставлены, автореферат полностью соответствует диссертации. И вы знаете, замечания у меня были, но они были технического характера. Например, в списке литературы отсутствуют страницы в пяти

ссылках. Но дальше я не буду здесь ничего говорить. Все отражено в девяти публикациях, хороших статьях. И в заключении я коротко расскажу, прочитаю волшебные слова, что диссертационная работа Полины Александровны Котельниковой «Конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных белков для онкотераностики», представленная к защите на соискании ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология», полностью соответствуют всем требованиям и критериям пункта 9, установленным положением, утвержденным правительством Российской Федерации в 2013 году и всеми последующими дополнениями и изменениями, а Полина Александровна Котельникова, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, спасибо. Насколько я понял, второй оппонент не требует ответа. Пожалуйста, Полина Александровна, заключительное слово вам.

Котельникова П.А., соискатель: Спасибо! Большое спасибо оппонентам и ведущей организации, которые поработали над рецензированием моего доклада. Конечно, основную благодарность хочется высказать научному руководителю, который дал мне возможность работать и освоить такое количество методов, благодаря тому количеству оборудования, которое в нашей лаборатории есть, и заниматься теми научными задачами, которые были бы интересны мне и моим коллегам. И хочется поблагодарить своих коллег, лабораторию молекулярной иммунологии: и тех, которые присутствуют в зале, и тех, кто теперь работает в других лабораториях, Викторию Олеговну Шипунову, за советы, руководство и помощь и, конечно, неоценимый вклад в эту работу, потому что, как справедливо заметил оппонент, большая часть работы была бы невозможна без командных действий, без сотрудничества. И большое спасибо всем присутствующим за то, что заслушали доклад. Большое спасибо!

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, Полина Александровна. Так, уважаемые коллеги, конечно, еще нужно было дискуссии, наверное, проводить, но я думаю, что настолько все ясно, что диссертации блестящая, поэтому я предлагаю счетную комиссию в составе Долгих, Дзантиева и Олейникова. Прошу проголосовать. Кто за? Возражений нет? Спасибо. Значит, коллеги, голосуем. Давайте проголосуем.

(Идет тайное голосование)

Олейников В.А., учёный секретарь: Уважаемые члены диссертационного совета. Счетная комиссия завершила свою работу. Котельникова Полина Александровна. Роздано бюллетеней – 20, оказалось в урне бюллетеней – 20, за – 20, против и недействительных нет.

Мирошников А.И.: Поздравляем, коллеги, с успешной защитой. Последнее, значит, проект заключения диссертационного совета. Есть ли замечания? (*Заключение принято единогласно*). Спасибо.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

