

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Генеральный директор  
ФГБУ «Федеральный центр мозга  
и нейротехнологий ФМБА России»  
член-корреспондент РАН,  
доктор биологических наук  
В.В. Белоусов



августа 2024 г.

### **ОТЗЫВ**

**ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертационную работу

**Ивановой Анны Валерьевны**

на тему: «Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа в исследовании клеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии»,  
представленную к защите на соискание ученой степени  
кандидата химических наук по специальности  
2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки)

### **Актуальность диссертационного исследования**

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) представляет собой инструмент визуализации ультраструктуры клетки с нанометровым разрешением порядка 1-3 нм. Визуализация биологических объектов методом электронной микроскопии поможет выяснить многие нерешенные проблемы и неизвестные аспекты взаимодействия биологических макромолекул в клетке с точностью до нанометров. ПЭМ, например, может определить конкретные белки, обеспечивающие контакт вирусных частиц с живыми клетками. С другой стороны, можно будет глубже понять механизмы взаимодействия и субмолекулярное устройство различных транскрипционных и трансляционных факторов, выявить антител-связывающие эпитопы в составе антигенов и пр. Детекция специфических

белков и структур в электронно-микроскопических изображениях остается нерешенной проблемой. На сегодняшний день единственным способом для визуализации биомолекул является мечение антител наночастицами золота («Immunogold»). Однако данным методом очень трудно проводить одновременную визуализацию нескольких молекулярных мишеней в клетке.

Сказанное выше позволяет считать актуальной тему диссертационной работы Ивановой А.В., посвященную разработке нового метода детекции различных биомолекул, где впервые будут использованы наночастицы сложных оксидов железа в качестве метки (регистрируемой с помощью ПЭМ в тандеме с энергодисперсионным анализом) и высокоспецифичные антитела к клеточному антигену. Этот метод не имеет аналогов в мире и может существенно расширить возможности электронной микроскопии в рамках исследования внутриклеточных структур.

#### **Научная новизна исследования**

В работе была разработана оригинальная методика синтеза наночастиц  $MFe_2O_4$  ( $M=Mn, Co, Zn$ ) в бензиловом спирте, а также исследовано влияние бензилового спирта и дибензилового эфира совместно с олеиновой кислотой на элементный состав получаемых наночастиц. Показано, что использование молекул 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты и гетеробифункционального полиэтиленгликоля для функционализации поверхности наночастиц дает возможность получать стабильные водные коллоидные растворы наночастиц, позволяющие провести конъюгацию с антителами с сохранением их иммунохимической активности. Показано, что конъюгаты наночастиц с антителами способны связываться со специфическими антигенами в клеточных компартментах и могут быть визуализированы методом ПЭМ. Кроме того, впервые был проведен энергодисперсионный анализ в тандеме с СПЭМ HAADF, который позволил обнаружить с высоким разрешением единичные наночастицы  $CoFe_2O_4$ , связанные с антигеном, презентированным в митохондриях, а также достоверно идентифицировать катионный состав таких и подобных наночастиц.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Простота и адаптируемость разработанной экспериментальной методики синтеза по получению наночастиц сложных оксидов железа контролируемого элементного состава в данной диссертационной работе представляет собой практические рекомендации для широкого спектра применений в области нанотехнологий (Патент РФ №2787203, 2022). Практическая значимость работы также отражена в разработанном методе визуализации биологических объектов, объединяющем электронную микроскопию с энергодисперсионным рентгеновским анализом, используя нанозонды на основе наночастиц сложных оксидов железа, позволит детектировать сразу несколько мишеней, где каждый вид атомов можно картировать определенным цветом, увеличивая при этом разрешение до сверхвысоких величин (1-3 нм) (ноу-хау НИТУ МИСИС № 05-645-2020 от 2 декабря 2020 на «Способ одновременной визуализации биологических структур»).

## **Характеристика содержания диссертационной работы**

Диссертационная работа, представленная к рассмотрению, включает введение, три главы, заключение, выводы, список сокращений и список использованных источников литературы (238 работ, из них 235 зарубежных). Работа изложена на 145 страницах, содержит 49 рисунков и 17 таблиц.

Во введении обоснована актуальность темы исследования, приведены цель и задачи, отражена научная новизна и практическая значимость работы, описан личный вклад автора.

В первой главе представлен обзор литературы, в котором в логической последовательности приведены сведения и существующих методах визуализации биомолекул их достоинства и недостатки, в частности рассмотрена световая, флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения (SIM-микроскопия, STED-микроскопия, SMLM-микроскопия), электронная микроскопия. На основе существующего зонда для визуализации внутриклеточных структур методом электронной микроскопии автором предложена новая структура и предложены требования к ней предъявляемые. Подробно рассмотрены методы получения наночастиц оксида железа их стабилизация и функционализация.

Во второй главе (Методическая часть) приведены характеристики использованных реагентов, методики анализов и методики проведения экспериментов, а также способов обработки экспериментальных данных.

В третьей главе описаны особенности получения наночастиц, приведены результаты исследований их физико-химических свойств (ПЭМ, СПЭМ, ЭДРС, РФА, магнитометрия, мёссбауэровская спектроскопия, МП-АЭС). Показано, что поверхность наночастиц может быть функционализирована органической оболочкой посредством реализации механизма прямого ковалентного связывания наночастиц непосредственно с лигандом. Введение дополнительной стадии модификации поверхности наночастиц молекулами ПЭГ-СООН позволило обеспечить агрегативную устойчивость таких наночастиц в PBS и сохранить ее в течение 48 часов. Разработан оригинальный метод конъюгации антител с модифицированными наночастицами, который позволил сохранить агрегативную устойчивость разработанного конъюгата в течение 30 дней. Экспериментально автором было установлено, что включение антител в состав конъюгата не влияет на их иммунохимические свойства, что подтверждено методом ИФА. Показаны результаты исследования визуализации биомолекул методами ПЭМ и СПЭМ НАADF в тандеме с ЭДСР.

Все результаты исследований изложены автором достаточно подробно, проиллюстрированы, исчерпывающе научно обсуждены.

В заключении автор обобщает научные результаты. Выводы логически следуют из анализа экспериментальных данных и отражают основные положения диссертации.

Диссертация построена в логическом порядке, написана грамотно, автор использует современную научную терминологию.

В автореферате, изложенном на 17 страницах, отражается основное содержание диссертации и выводы, а также приводится список публикаций, которые отражают основное содержание работы. Материалы диссертации прошли широкую апробацию на конференциях всероссийского и международного уровня.

По основным результатам работы опубликовано 16 печатных работ, в числе которых 1 статья, входящая в базу научного цитирования РИНЦ, 3 статьи, входящие в базы данных научного цитирования Scopus/Web of Science, 1 ноу-хау, 1 патент на изобретение.

## Рекомендации и замечания

Принципиальные замечания к работе отсутствуют. В качестве рекомендаций можно отметить, что для валидации специфичности полученных нанозондов было бы более убедительно использовать не рутинную флуоресцентную микроскопию низкого разрешения, а сканирующую лазерную конфокальную микроскопию с иммерсионным объективом или, в идеале, — флуоресцентную микроскопию сверхвысокого разрешения (SIM или STORM), которая позволила бы более детально локализовать исследуемые антигены. Кроме того, автор в качестве вторичных антител использовала анти-мышинные и анти-кроличьи антитела с единственной меткой – Alexa Fluor 488. Качество флуоресцентных изображений можно было бы существенно улучшить и сделать детекцию, действительно, мультиспецифичной, используя коктейли первичных и вторичных антител с разными флуоресцентными метками (например, goat anti-mouse Alexa Fluor 488 и goat anti-rabbit Alexa Fluor 633 с первичными Ат соответствующей видовой принадлежности). Эти замечания носят сугубо технический характер и не влияют на общую, безусловно, позитивную оценку работы.

## Заключение

Диссертация Ивановой Анны Валерьевны на тему «Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа в исследовании клеточных структур методом просвечивающей электронной микроскопии», выполненная под руководством к.х.н. Абакумова Максима Артемовича, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук, является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача — был разработан способ получения и синтезированы наночастицы сложных оксидов железа  $Fe_3O_4$  и  $MFe_2O_4$  с контролируемым элементным составом и магнитными свойствами. На основе полученных наночастиц были синтезированы стабильные в водных растворах нанозонды с модифицированной поверхностью, декорированные антителами, показавшие в экспериментах *in vitro* специфическую иммунореактивность.

По объему выполненных исследований, научному и методическому уровню их проведения, по актуальности, новизне, практической значимости для науки и практики полученных результатов диссертационная работа «Синтез и применение наночастиц сложных оксидов железа в исследовании клеточных структур методом

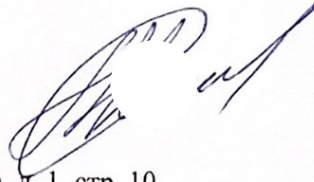
просвечивающей электронной микроскопии», представленная на официальное оппонирование соответствует требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки), а ее автор - Иванова Анна Валерьевна - заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 2.6.6. Нанотехнологии и наноматериалы (химические науки).

Отзыв на кандидатскую диссертацию Ивановой Анны Валерьевны был рассмотрен и одобрен на расширенном семинаре лаборатории нейрогенерации ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России» 01.08.2024 (протокол № 1).

Отзыв составил:

д.м.н. по специальности 03.04.01 «Биохимия»,  
зам. генерального директора по науке,  
заведующий лабораторией нейрогенерации  
ФГБУ «Федеральный центр мозга  
и нейротехнологий ФМБА России»

<01> августа 2024 года



В.П. Баклаушев

Адрес: 117513, Москва, Островитянова, д. 1, стр. 10

ФГБУ «ФЦМН» ФМБА России

Тел: +7 (495) 280-35-50 доб. 7755;

e-mail: [baklaushev@fccps.ru](mailto:baklaushev@fccps.ru).

Подпись	<u>В.П. Баклаушев</u>
заверяю	
Ученый секретарь ФГБУ "ФЦМН"	
ФМБА РОССИИ	
К.М.Н.	<u>А.Ю. Суворов</u>

**Сведения о ведущей организации:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России.

Индекс, почтовый адрес: 117513, Москва, Островитянова, д. 1, стр. 10

E-mail: [edu@fccps.ru](mailto:edu@fccps.ru), Телефон: 8-495-280-35-50

