

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 14 марта 2018 г. № 3

О присуждении **Кашириной Елене Игоревне**, гражданке РФ, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Разработка системы гипоаллергенной упаковки белков в полимерный матрикс» по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 20.12.2017 г., протокол № 23 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10 (действует на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.).

Соискатель Каширина Елена Игоревна 1991 года рождения. В 2013 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова» по специальности инженер-биотехнолог. С 2013 по 2017 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Работает инженером-исследователем в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в лаборатории клеточных взаимодействий. Диссертация выполнена в лаборатории клеточных взаимодействий в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН).

Научный руководитель – кандидат биологических наук Свирцевская Елена Викторовна, старший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Кедик Станислав Анатольевич, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский

технологический университет» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Кильдеева Наталия Рустемовна, доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и композитов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный университет имени А.Н.Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство)», дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Стениной Мариной Александровной, доктором медицинских наук, профессором кафедры иммунологии медико-биологического факультета и утвержденном проректором по научной работе ФБГОУ ВО РНИМУ Министерства здравоохранения РФ Д.В. Ребриковым, указала, что представленная к защите диссертация соответствует требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор, Каширина Елена Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет по теме диссертации 7 работ объемом 5,6 печ. листов, опубликованные в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций. В 4 из них соискатель является первым автором. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных автором работах.

Наиболее значимые работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. **Каширина Е. И.**, Решетов П. Д., Алексеева Л. Г., Зубов В. П., Свирщевская Е. В., Иммуногенность белков, капсулированных в полимерные наночастицы на основе хитозана альгината // Российский иммунологический журнал РАН, 2014, том 8 (17), № 3, 901- 904, 2014.

2. **Е.И. Каширина**, П.Д. Решетов, Л.Г. Алексеева, С.В. Хлгатын, Д.Ю. Рязанцев, С.В. Гурьянова, В.П. Зубов, Е.В. Свирщевская. Капсулирование аллергенов клещей домашней пыли в наночастицы на основе хитозана и альгината // Российские нанотехнологии, 2015, том 10, № 7– 8, стр. 98-104.

3. **Каширина Е.И.**, Савина А.А., Щербинина Т.С. Характеристика иммунного ответа на противоаллергенную капсулированную вакцину // Российский иммунологический

журнал РАН 2015, том 9 (18) №2 (1), 245-246.

4. **E. Kashirina**, P,Reshetov, L. Alekseeva, V. Berzhets, D. Ryazantsev, V. Zubov, D. Chudakov, E. Svirshevskaya / Encapsulation of allergens into chitosan-alginate nanoparticles prevents IgE binding // J.J. Vaccines Vaccination 2015, 1(3): 012

На диссертацию поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.х.н. Кильдеевой Наталии Рустемовны, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

Диссертант использует способ изложения материала с подробным обоснованием не только методологии и методик, но и каждого из используемых компонентов, вплоть до растворителей, буферных растворов, pH-среды и т.п. С одной стороны, это указывает на тщательность постановки эксперимента, но с другой, затрудняет восприятие материала, маскируя значимые результаты.

Из текста диссертации очевидно, что часть выполненной работы осталась за пределами диссертации, что не всегда обосновано. Например, на стр. 98 «В процессе исследований было установлено, что для получения конструкций оптимального размера ... реакцию следует проводить при следующих условиях», однако, сами исследования не приводятся. На стр. 101 «Увеличение процентного содержания этанола в растворителе способствует повышению вязкости раствора», однако не приведены соответствующие экспериментальные зависимости или ссылки на опубликованные работы, а в таблице 7 вязкость упоминается только на качественном уровне «низкая вязкость». Не ясно, был ли разработан автором или использовался известный прием формирования наночастиц лаурилсукциноилхитозана путем диализа его водно-спиртового раствора.

В диссертации и автореферате встречаются опечатки и неудачные выражения: «природа материала дисперсной фазы и дисперсионной среды», средний размер частиц в таблице 6 ЛСХ2 указан 50-1280 нм (это доверительный интервал, а не среднее значение). «Хитозан является производным хитина, природного поликатиона» (поликатионом является хитозан, а не хитин).

2. Отзыв официального оппонента д.т.н. Кедика Станислава Анатольевича, отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1. Работа содержит орфографические ошибки и стилистические неточности. 2. Большинство рисунков выполнено на высоком уровне, однако встречаются исключения, в частности на рисунках 11, 15, 19 подписи на рисунке и масштаб не читаются. 3. Ссылки в тексте на рисунки и сами рисунки 3 и 4 не совпадают по смыслу, приведен рисунок 9, но не хватает его описания или расшифровки в тексте. 4. В диссертации недостаточно подробно приведены методы и параметры, используемые в расчетных методах, на некоторых рисунках не приведены разбросы величин. 5. В диссертации предлагается использование хитозана в

качестве материала для медицинского применения, но на этот материал нет фармакопейной статьи т.е. применение его в медицине не разрешено.

3. Отзыв ведущей организации положительный, содержит следующие замечания: 1. В первой главе раздела «Результаты и их обсуждение» следовало бы сначала изложить данные по получению микрочастиц двумя методами (самосборкой и электроспреем), а затем поместить данные по включению модельных белков, что облегчило бы восприятие работы. 2. В подписях к рисункам встречаются сокращения, что затрудняет восприятие материала. 3. В списке литературы встречается мало отечественных литературных источников, хотелось бы, чтобы отечественные работы были лучше освещены. 4. Не хватает обоснования факта проникновения отрицательно заряженных нано- или микрочастиц производных хитозана в клетку. Традиционно считается, что положительно заряженные молекулы легко взаимодействуют с отрицательно заряженной мембраной клеток и легче проникают в клетку.

На автореферат поступили отзывы:

1. Кандидата химических наук, старшего научного сотрудника лаборатории инженерии биополимеров Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук Лопатина Сергея Александровича. Отзыв положительный, не содержит критических замечаний.

2. Доктора химических наук, руководителя подразделения группы биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Марквичевой Елены Арнольдовны. Отзыв положительный, не содержит критических замечаний.

3. Доктора химических наук, профессора учебно-научного центра «Биоматериалы» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Ярослава Олеговича Межуева. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: на рисунке 2А приведено не звено хитозана (как утверждается в подрисуночной подписи), а соответствующий моносахарид, полимером которого является хитозан. Очевидно, следовало бы указать положения, через которые идет сочленение цепи, особенно в контексте анализа ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектров хитозана и лаурилсукциноилхитозана. При обсуждении данных о распределении частиц по размерам следовало указать, о каком типе распределения идет речь: распределение по числу или по объему

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что они являются специалистами в области биотехнологии, в частности, исследования

полисахаридов природного происхождения, в том числе хитозана, а также в области создания различных биоматериалов для биотехнологии и медицины, что подтверждается наличием у них большого количества публикаций в данных областях науки. Их высокая квалификация позволяет им дать объективную оценку научной и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: разработана структура оболочки для капсулирования белков, которая предотвращает контакт IgE с белком, но сохраняет иммуногенность белка, что может быть использовано как для АСИТ, так и для создания вакцин с любыми белками и пептидами. Впервые получены капсулированные вакцины на основе рекомбинантных аллергенов из клещей домашней пыли *D. farinae* и грибов *Aspergillus fumigatus*, впервые показана способность однослойной упаковки аллергенов значительно снижать распознавание IgE, а двухслойной упаковки – полностью блокировать распознавание капсулированных аллергенов. Впервые определена в экспериментах *in vivo* иммуногенность капсулированных белков. Также впервые в мышинной модели аллергии показано, что иммунизация капсулированными аллергенами безопасна и вызывает формирование IgG антител после 3-х иммунизаций, что значительно быстрее, чем при проведении традиционной АСИТ. Впервые показано в мышинной модели, что индукция IgG к аллергенам приводит к медленному снижению IgE, как это наблюдается при проведении АСИТ в клинике.

Теоретическая значимость работы состоит в разработке структуры, методов получения капсулированных белков, а также в доказательстве быстрого формирования протективного иммунного ответа при проведении АСИТ.

Практическая значимость работы состоит в доказательстве отсутствия связывания IgE с капсулированными в двойную оболочку аллергенами, что позволяет провести АСИТ в течение 1-3 месяцев в отличие от 3-5 лет, требуемых для традиционной АСИТ. Отсутствие контакта IgE и аллергена при проведении АСИТ также обеспечивает безопасность терапии. Таким образом, решено две проблемы традиционной АСИТ: значительно снижена длительность терапии и повышена ее безопасность. Последней проблемой является эффективность АСИТ. Показано, что формирование IgG к аллергенам не полностью блокирует продукцию IgE, уровень которой снижается медленно, аналогично наблюдаемому в клинике при проведении АСИТ. Для решения проблемы эффективности требуется понимание механизмов формирования IgE-продуцирующих клеток. Помимо этого, расширены знания о физико-химических и биологических свойствах материалов, полученных с помощью ионного гелеобразования на основе полисахаридов альгината и хитозана. Применительно к проблематике

диссертации использован комплексный экспериментальный подход, включающий современные методы биотехнологии, биохимии, иммунологии. Изложены экспериментальные доказательства способности биоматериалов на основе альгината и хитозана блокировать связывание антител класса Е с белками-аллергенами.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные работы были проведены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость методик и результатов исследования в различных условиях, выводы базируются на результатах проверенных методик. Теоретические предположения и концепции, использованные в работе, построены на основе современных литературных данных. В ходе работы использованы современные биотехнологические подходы получения рекомбинантных белков, синтеза модифицированных полисахаридов, конъюгации полисахаридов с белком.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в проведении литературного поиска по теме работы, в постановке научных экспериментов и получении экспериментальных данных, анализе полученных результатов.

Все экспериментальные работы выполнены лично Кашириной Е.И., за исключением результатов, полученных при использовании человеческих сывороток крови, которые были проведены совместно с сотрудником лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН, к.б.н. Фаттаховой Г.В. Соискатель участвовала в апробации результатов исследования на международных и российских конференциях, лично готовила основные публикации к печати.

На заседании 14 марта 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Кашириной Елене Игоревне ученую степень кандидата химических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 8 докторов наук по профилю диссертации (специальность 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 1.

Заместитель председателя  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д. ф.-м.н. Олейников В.А.

