

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,
созданного 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 доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 04 декабря 2019 г. №22

О присуждении **Генераловой Алле Николаевне** ученой степени доктора химических наук.

Диссертация «**Мультифункциональные полимерсодержащие дисперсные микро- и наноструктуры для биотехнологии и биомедицины**» по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 17.07.2019 г., протокол № 11 Диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10), и действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель, Генералова Алла Николаевна 1965 г. рождения, диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук «Получение биоаналитических реагентов на основе полимерных дисперсий» по специальности 02.00.06 - химия высокомолекулярных соединений защитила в 2000 г. в диссертационном совете Д 063.41.05, созданном на базе Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова (диплом кандидата наук КТ №032742), работает старшим научным сотрудником и выполнила диссертацию в лаборатории полимеров для биологии из отдела биоматериалов и бионанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный консультант – доктор химических наук **Зубов Виталий Павлович**, руководитель лаборатории полимеров для биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Егоров Алексей Михайлович - академик РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (МГУ);

Кочетков Сергей Николаевич - академик РАН, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН);

Горин Дмитрий Александрович - доктор химических наук, профессор центра фотоники и квантовых материалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» («РХТУ им. Д.И.Менделеева») в своем положительном заключении, подготовленном д.х.н., проф., зав. кафедрой биоматериалов Штильманом М.И. и утвержденном проректором по науке, доктором химических наук, доцентом Щербиной Анной Анатольевной, указала, что диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой представлено развитие перспективного научного направления по созданию набора дисперсионных структур, обладающих комплексом специальных свойств, для биотехнологии и биомедицины, а ее автор Генералова Алла Николаевна заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры биоматериалов 5 ноября 2019 г., протокол №3).

Генералова А.Н. имеет 56 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 49 работ общим объемом 36 печатных листов, опубликованных в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, из них - 5 обзоров, кроме того имеется 3 патента и 1 монография. Соискателем опубликовано 68 работ в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов. Во всех представленных статьях соискатель принимал активное участие на стадии экспериментальной работы, обсуждения полученных результатов, подготовки статьи к печати. Генералова А.Н. является первым автором в 17 статьях, опубликованных по теме диссертации. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах. Наиболее значимые работы из рецензируемых научных изданий:

1. **A.N. Generalova**, S.V. Sizova, T.A. Zdobnova., M.M. Zarifullina, M.V. Artemyev, A.V. Baranov, V.A. Oleinikov, V.P. Zubov, S.M. Deyev, Submicron polymer particles containing fluorescent semiconductor nanocrystals CdSe/ZnS for bioassays, *Nanomedicine*, 2011, V. 6, p.195-209. IF 4.8
2. **A.N. Generalova**, M.M. Zarifullina, E.V. Lankina, S.V. Sizova, M.V. Artemyev, V.P. Zubov, V.A. Oleinikov, Optical sensing quantum dot-labeled polyacrolein particles prepared by layer-by-layer deposition technique, *J. of Colloid and Interface Science*, 2011, V.357, 265-272. IF 6.3
3. **A.N. Generalova**, V.A. Oleinikov, A. Sukhanova, M.V. Artemyev, V.P. Zubov, I. Nabiev. Quantum dot-containing polymer particles with thermosensitive fluorescence, *Biosensor and Bioelectronics*, 2013, V.39, 187-193, IF 9.2.
4. A.E. Guller, **A.N. Generalova**, E.V. Petersen, A.V. Nechaev, I.A. Trusova, N.N. Landyshev, A. Nadort, E.A. Grebenik, S.M. Deyev, A.B. Shekhter and A.V. Zvyagin, Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells, *Nano Research*, 2015, 8 (5), 1546-1562, IF 8.5.
5. **A.N. Generalova**, I.K. Kochneva, E.V. Khaydukov, V.A. Semchishen, A.E. Guller, A.V. Nechaev, A.B. Shekhter, V.P. Zubov, A.V. Zvyagin and S.M. Deyev, Submicron polyacrolein particles *in situ* embedded with upconversion nanoparticles for bioassay, *Nanoscale*, 2015, 7, 1709-1717, IF 6.9.
6. E.V. Khaydukov, K.E. Mironova, V.A. Semchishen, **A.N. Generalova**, A.V. Nechaev, D.A. Khochenkov, E.V. Stepanova, O.I. Lebedev, A.V. Zvyagin, S.M. Deyev & V.Ya. Panchenko, Riboflavin Photoactivation By Upconversion Nanoparticles For Cancer Treatment. *Scientific Reports*. 2016, 6, 35103; IF 4.02

7. **Generalova A.N.**, Chichkov, B.N., Khaydukov, E.V., Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 245C, 1-19. IF 8.2
8. K.E. Mironova; D.A. Khochenkov, **A.N. Generalova**, V.V. Rocheva, N.V. Sholina, A.V. Nechaev, V.A. Semchishen, S.M. Deyev, A.V. Zvyagin, E.V. Khaydukov, Ultraviolet phototoxicity of upconversion nanoparticles illuminated with near-infrared light, *Nanoscale*, 2017, 9,14921 IF 6.9
9. V.V. Rocheva, A.V. Koroleva, A.G. Savelyev, K.V. Khaydukov, **A.N. Generalova**, A.V. Nechaev, A.E. Guller, V.A. Semchishen, B.N. Chichkov & E.V. Khaydukov, High-resolution 3D photopolymerization assisted by upconversion nanoparticles for rapid prototyping applications, *Scientific Reports*, 2018, 8:366. IF 4.02
10. Guller A.E., Nadort A., **Generalova A.N.**, Khaydukov E.V., Nechaev A.V., Kornienko I.A., Petersen E.V., Liang L., Shekhter A.B., Qian Y., Goldys E.M., Zvyagin A.V., Rational Surface Design of Upconversion Nanoparticles with Polyethylenimine Coating for Biomedical Applications: Better Safe than Brighter? *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4(9):3143-3153, IF 4,43
11. V.A. Oleinikov, A. Sukhanova, **A.N. Generalova**, S.V. Sizova, K.E. Mochalov, A.A. Chistyakov, M.A. Artemyev, I. Nabiev, Nanoprobes on the basis of semiconductor nanocrystals for bioassays and biosensing, *FEBS Journal*: 280, Special Issue 1, 2013, 275, IF 4.5.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента академика РАН Егорова А.М. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «Результаты биологических исследований освещены без указания конкретных данных о свойствах антигенов, антител, типов клеток, условий проведения анализов, что не дает возможности глубже оценить достоинства разработанных частиц. Большое количество приведенных исследований не позволило привести данные стандартных исследований, которые играли бы роль референс исследований и контроля. Это ограничивает возможность обсуждения преимуществ тех или иных методов.»

2. Отзыв официального оппонента академика РАН Кочеткова С.Н. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «В работе рассматриваются способы получения микрочастиц на основе акролеина, наполненных органическими красителями и неорганическими нанокристаллами (квантовыми точками), но не приведен сравнительный анализ их преимуществ и недостатков. Для проведения реакции латексной агглютинации со спектрофотометрической детекцией результатов были получены конъюгаты частиц с антителами при участии спэйсерной молекулы, в частности, аминокaproновой кислоты. Использовали ли данный подход получения конъюгатов через спэйсерные молекулы в других видах анализа и имели они какие-либо преимущества? В диссертации показаны уникальные свойства и несомненные преимущества применения НАФ в *in vivo* исследованиях. Однако для представления более полной картины, желательно, чтобы были приведены данные по накоплению НАФ в органах ретикуло-эндотелиальной системы. В работе не нашел отражение вопрос о собственной токсичности рибофлавин мононуклеотида при отсутствии облучения в сравнении с традиционными фотосенсибилизаторами.»

3. Отзыв официального оппонента проф., д.х.н. Горина Д.А. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «В работе использовалась модификация поверхности частиц НАФ молекулами полиэтиленгликоля для увеличения времени циркуляции в кровеносной системе. Как молекулярная масса полиэтиленгликоля влияет на время циркуляции частиц? Если экспериментов, направленных на оптимизацию молекулярной массы ПЭГ не проводилось, то из каких соображений был выбран ПЭГ,

который был использован в работе? Из текста работы не совсем понятно проводились ли исследования гемосовместимости нано- и микрочастиц, которые обычно предваряют *in vivo* эксперименты. Если такие эксперименты проводились, то как модификация поверхности нано- и микрочастиц влияет на их гемосовместимость? Как было показано ранее в работах Вольфгана Парака и других авторов определяющее значение в биораспределении частиц имеет так называемый “корона” эффект, заключающийся в адсорбции белков плазмы крови на поверхность частиц. Хотелось бы услышать комментарии автора о том, как изменится дзета-потенциал и размер частиц вследствие взаимодействия поверхности наночастиц с белками плазмы крови? Автор использовал в работе направляющие молекулы, например, миниантитела 4D5scFv. Исследовалась ли стабильность данных молекул на поверхности частиц *in vitro* и *in vivo*? Стр.85. Очистка полимерных дисперсий. Автор дает информацию о режимах работы центрифуги в об/мин, необходимо дублировать этот параметр в г, эти данные дают возможность воспроизвести результаты, полученные автором, используя центрифуги других производителей. Стр.101. Автор использует для модификации в 15 раз большую концентрацию ПЭИ (15 мг/мл), чем обычно используют в технологии последовательной адсорбции (Layer by Layer assembly), с чем связана эта необходимость? Стр.114. Рисунок III.2. Почему зависимости выходят на плато? Почему наличие красителя так сильно влияет на диаметр частиц?» Есть замечания по оформлению работы.

4. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания: «При получении микрочастиц с термочувствительной флуоресценцией в работе использована затравочная полимеризация N-винилкапролактама в присутствии частиц на основе сополимера акролеина со стиролом. Из представленных данных не совсем ясно, как контролировали процесс полимеризации, чтобы избежать формирования новой фракции частиц из поли-N-винилкапролактама в объеме. Из литературы известно, что для получения частиц на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), характеризующихся продолжительным временем циркуляции в организме лабораторных животных, обычно используют ПЭГ с молекулярной массой 2-5 кДа. В работе нанофосфоры модифицировали ПЭГ с молекулярной массой 0,5 кДа. Представляется целесообразным объяснить такой выбор. В работе имеются отдельные опечатки и грамматические ошибки.»

5. Отзыв на автореферат академика РАН Конова Виталия Ивановича - руководителя Центра естественно-научных исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН и к.ф.-м.н. Никитина Петра Ивановича - заведующего лабораторией «Биофотоника» того же Центра. Отзыв положительный, без замечаний.

6. Отзыв на автореферат д.б.н. Жарниковой Ирины Викторовны - ведущего научного сотрудника научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора. Отзыв положительный, без замечаний.

7. Отзыв на автореферат д.ф.-м.н. Завестовской Ирины Николаевны - с.н.с., руководителя Высшей школы физиков им. Н.Г.Басова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет». Отзыв положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации

обосновывается их широко известными достижениями в области биотехнологии и бионанотехнологий, что подтверждается наличием значительного количества публикаций в данной сфере исследований в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. РХТУ им. Д.И.Менделеева является признанным лидером в разработке научных основ для получения новых материалов с заданной структурой для биомедицины. Егоров А.М. разработал научные основы высокочувствительных методов биоспецифического анализа с использованием ферментов и наночастиц. Кочетков С.Н. является одним из ведущих специалистов в области физико-химической биологии, биохимии и клеточной биологии. Работы Горина Д.А. связаны с разработкой подходов к управлению физико-химическими свойствами дисперсных наноструктур и микрообъектов. Их высокая квалификация в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также о теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

-разработаны научные основы получения и практического применения дисперсных микро- и наноструктур с требуемой функциональностью в биотехнологии и биомедицине;
-предложены подходы для создания набора дисперсий микрочастиц на базе одного мономера (акролеина) методом гетерофазной полимеризации с эффективным управлением коллоидными и химическими свойствами;

-разработана методология получения биофункционализированных микроструктур на основе частиц дисперсий для создания диагностических тестов и биовизуализации *in vivo*;

-доказана перспективность использования гибридных органо-неорганических микрочастиц, содержащих флуоресцентные неорганические нанокристаллы, для визуализации биоспецифических взаимодействий и создания оптических биосенсоров;

-обосновано использование метода замены растворителя для получения гидрофилизированных коллоидно-стабильных апконвертирующих нанофосфоров с различной функциональностью, что позволило их использовать для мечения клеток, пассивной доставки в раковые опухоли и решения задач тераностики.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

-применительно к проблематике диссертации эффективно использованы методы гетерофазной полимеризации и гидрофизации поверхности неорганических наночастиц, комплекс экспериментальных методик по исследованию физико-химических и коллоидных свойств дисперсий, а также методы биоанализа и оптической визуализации;

-установлены закономерности формирования полиакролеинсодержащих микросфер в присутствии красителей, аминов, неорганических наночастиц, второго мономера для получения дисперсий, отвечающих требованиям различных видов биоанализа;

-изучены условия формирования гибридных органо-неорганических микрочастиц для биоаналитических исследований при введении неорганических нанокристаллов как в объем полимерной матрицы, так и при включении в покрытия из стимул-чувствительных полимеров на поверхности микрочастиц;

-установлены закономерности формирования полимерного покрытия на поверхности апконвертирующих нанофосфоров, которые легли в основу создания наноструктур для *in*

vitro и *in vivo* биоисследований.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

-*получены* микроструктуры на основе полиакролеин-содержащих частиц, которые позволили разработать тест-системы на основе метода латексной агглютинации для определения различных аналитов.

-*разработан* простой, чувствительный метод ингибирования латексной агглютинации с визуальной и инструментальной детекцией результатов для определения гербицидов.

-*разработаны* способы получения гибридных микроструктур на основе полимерных частиц и квантовых точек, которые являются перспективной платформой биореагентов, используемых для визуализации рецепторов раковых клеток и создания биосенсоров.

-*показано*, что наноструктуры на основе апконвертирующих нанофосфоров, возбуждаемых светом из ближнего ИК-диапазона, имеют большой потенциал для проведения *in vivo* исследований и решения задач тераностики.

Разработанные автором мультифункциональные микро- и наноструктуры целесообразно использовать в научно-исследовательских институтах медицинского и биотехнологического назначения, в центрах иммунодиагностики, на предприятиях системы санитарно-эпидемиологического надзора и экологического контроля.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что идея работы базируется на комплексном анализе результатов исследований в области дисперсий частиц и их применения в биотехнологии и биомедицине. Теоретическая база работы соответствует основным концепциям, принятым в современной науке. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современного сертифицированного оборудования и комплекса различных высокочувствительных физико-химических, биологических методов анализа.

Личный вклад соискателя состоит в активном участии на всех этапах исследования: в постановке задачи, планировании и проведении ключевых экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных. Весь экспериментальный материал получен лично автором и руководимыми им сотрудниками, за исключением экспериментов на клетках по биовизуализации, проводимых в лаб. молекулярной иммунологии ИБХ РАН под рук. академика С.М. Деева. Работы по визуализации *in vivo* проводили во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН при участии сотрудников РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Анализ полученных данных, а также подготовка научных публикаций выполнены лично или при активном участии автора. Научные положения и выводы, сформулированные соискателем теоретически обоснованы и не вызывают сомнений

Диссертационный совет Д 002.019.01 постановил, что диссертационная работа Генераловой Аллы Николаевны является законченной научно-квалификационной работой в области биотехнологии, в которой, на примере полиакролеинсодержащих частиц и апконвертирующих нанофосфоров, решена важная научно-техническая проблема разработки принципов и методологии создания набора биофункционализированных микро- и наночастиц, обладающих комплексом специальных свойств, необходимых для их применения в различных видах биоанализа, а также для биовизуализации и терапии, которая вносит существенный вклад в развитие теории и практики таких областей знаний,

как бионанотехнологии и биомедицина. По своему содержанию работа соответствует паспорту специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) в части 1 и 8.

По актуальности, новизне, практической значимости диссертация отвечает требованиям п. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

На заседании 4 декабря 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Генераловой А.Н. ученую степень доктора химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 10 докторов наук (по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель диссертационного совета
академик РАН



В.Т. Иванов

Ученый секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н.

В.А. Олейников

6 декабря 2019 г.