

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
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 кандидата биологических наук
аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 18 января 2023 г. № 2

О присуждении **Яременко Алексею Владимировичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Определение биodeградации и токсичности магнитных наночастиц в процессах их взаимодействия с организмом» по специальности 1.5.3 – молекулярная биология принята к защите 31.10.2022 г. (протокол заседания № 27) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10) и действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель – Яременко Алексей Владимирович, 29 марта 1994 года рождения. В 2018 г. окончил магистратуру Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» по специальности 19.04.01 – Биотехнология, направленность (профиль) образовательной программы: молекулярно-клеточная биотехнология и бионанотехнология. С 2018 по 2022 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Диплом об окончании аспирантуры (регистрационный номер 58) выдан 5 октября 2022 г. в ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН.

Научный руководитель – кандидат физико-математических наук Зелепукин Иван Владимирович, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты **Пятаев Николай Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии, руководитель сектора «Медико- биолого- химические материалы и препараты» Национального исследовательского Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева и **Попова Нелли Рустамовна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории изотопных исследований Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт экспериментальной

медицины в своем положительном отзыве, составленном и подписанном д.мед.н., профессором, чл.-корр. РАН, директором института экспериментальной медицины, главным научным сотрудником НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда, заведующим кафедрой патологии Института медицинского образования центра Алмазова Галагудзой Михаилом Михайловичем и утвержденном заместителем генерального директора по научной работе д.мед.н., проф., академиком РАН Конради Александрой Олеговной, указала, что диссертация Яременко Алексея Владимировича является завершённой квалификационной работой и полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении 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; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 9 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 5 работ общим объемом 8 печ.л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые А.В. Яременко внес основной либо существенный вклад, включают:

1. **A.V. Yaremenko**, I.V. Zelepukin, I.N. Ivanov, R.O. Melikov, N.A. Pechnikova, D.S. Dzhililova, A.B. Mirkasymov, V.A. Bragina, M.P. Nikitin, S.M. Deyev and P.I. Nikitin Influence of Magnetic Nanoparticle Biotransformation on Contrasting Efficiency and Iron Metabolism // Journal of Nanobiotechnology, 2022, Т. 20, № 1. С. 1–15.

2. I.V. Zelepukin*, **A.V. Yaremenko***, M.V. Yuryev, I.N. Ivanov, V.R. Cherkasov, S.M. Deyev, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin Long-Term Fate of Magnetic Particles in Mice: A Comprehensive Study // ACS Nano. 2021. Т. 15, № 7. С. 11341–11357. (* - равный вклад авторов)

3. I.V. Zelepukin*, **A.V. Yaremenko***, M.V. Yuryev, A.B. Mirkasymov, I.L. Sokolov, S.M. Deyev, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study // Journal of Controlled Release. 2020. Т. 326. С. 181-191. (* - равный вклад авторов)

4. I. V. Zelepukin*, **A. V. Yaremenko***, V. O. Shipunova, A. V. Babenyshev, I. V. Balalaeva, P. I. Nikitin, S. M. Deyev and M. P. Nikitin Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth // Nanoscale. 2019. Т. 11. № 4. С. 1636-1646. (* - равный вклад авторов)

5. I. V. Zelepukin*, **A. V. Yaremenko***, E. V. Petersen, S. M. Deyev, V. R. Cherkasov, P. I. Nikitin and M. P. Nikitin Magnetometry based method for investigation of nanoparticle clearance from circulation in a liver perfusion model // Nanotechnology. 2019. Т. 30, № 10. С. 105101. (* - равный вклад авторов)

На диссертацию поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.м.н., профессора Пятаева Николая Анатольевича, Отзыв положительный, содержит следующие вопросы:

- 1) Перфузия печени производилась при 20 °С. Однако *in vivo* все биохимические реакции, в том числе фагоцитоз, протекают при 37 °С. Проводился ли анализ влияния температуры на активность фагоцитоза?
- 2) Известно, что в среднем для бактерий и других чужеродных агентов продолжительность процесса фагоцитоза составляет от 40 минут до нескольких часов. В Вашей же работе, например, в разделе 4.6.3 указывается, что уже через 2 минуты из кровотока выводилось около 80% частиц. С чем это может быть связано?
- 3) В работе подробно описаны процессы биодegradации наночастиц оксида железа, сопровождающиеся разрушением их кристаллической структуры, образованием растворимых солей, которые могут быть выведены почками. Однако известно, что в ряде случаев полной деградации не происходит, а формируется гемосидерин. Какие факторы определяют путь деградации частиц, и что способствует образованию гемосидерина?

2. Отзыв официального оппонента к.б.н., Поповой Нелли Рустамовны, Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- 1) В работе встречаются неточности стилистического характера и небольшие опечатки.
- 2) В работе нет четкого изложения какие метаболиты наблюдаются при деградации наночастиц.
- 3) В разделе 3.2.4 нет указания о том, проводилась ли отмывка извлеченных органов от крови перед тем, как они фиксировали с формалином, то же самое касается и пункта 3.10.2, в то время как исследования проводились с детекцией частиц, абсорбированных на эритроцитах.
- 4) В разделе 3.10.3, посвящённом гематологическому анализу, представлены выборочные параметры крови, которые не включают, к примеру, значения лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, которые могли бы детальнее раскрыть взаимодействие наночастиц на организм. Схожим образом, в разделе 3.10.4. также представлены выборочные критерии биохимического анализа крови.
- 5) В литературе встречаются спорные данные о наличии опсонической активности у альбуминов в крови. Насколько данные литературы соотносятся с данными, полученными в перфузируемой модели печени?

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Замечания к данной работе носят рекомендательный характер и ограничиваются небольшими стилистическими неточностями изложения материала, отдельными опечатками и низким качеством некоторых рисунков, полученных из других источников. Указанные комментарии не снижают теоретическую и практическую ценность выполненной работы.

- 1) Разделы, посвящённые гематологическому и биохимическому анализу крови, указывают на то, что в работе были использованы выборочные параметры. Почему в работе не предоставлены полные данные по этим анализам?
- 2) Использование метода MPQ для оценки микроциркуляции наночастиц в хвостовых венах не приводило к тому, что наночастицы закупоривали сосуды у животных в хвостовой части и могли исказить полученные результаты?
- 3) В диссертационной работе не приведены критерии отбраковки при проведении исследований на животных. Использовались какие-либо критерии отбраковки экспериментальных животных, какие?

- 4) С чем связан выбор оценки экспрессии железосодержащих белков в 28 дней? Если рассматривать полученные результаты, то экспрессия трансферрина и ферропортина существенно выросла на 28 день и эти значения могли увеличиться в последующие дни.
- 5) Не было ли попыток провести гистологический анализ других органов, в частности легких?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и наномедицины, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Официальный оппонент Пятаев Н.А. является ведущим специалистом в области наномедицины, его работы посвящены в том числе разработке новых типов магнитных наночастиц, изучению их физико-химических свойств, исследованию параметров их взаимодействия с клетками и органами, а также их применению для доставки лекарственных препаратов и лечения злокачественных опухолей с помощью метода гипертермии. Тематика работ официального оппонента Поповой Н.Р. связана с разработкой новых типов наночастиц, исследованием их применения в диагностических и терапевтических целях, в том числе для контрастирования МРТ изображений и лечения злокачественных опухолей, а также с оценкой их токсичности на организм. Коллектив ведущей организации занимается вопросами изучения свойств магнитных наночастиц, изучением поведения магнитных наночастиц в организме после их внутривенного введения, разработкой способов доставки лекарственных препаратов на поверхности магнитных наночастиц, а также изучению поведения магнитных наночастиц в организме и оценки их органотоксичности. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской работы и высокой квалификацией, что позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что в данной работе предложен новый способ исследования в реальном времени печеночного клиренса наночастиц в изолированной перфузируемой печени, основанный на методе магнитометрической регистрации, и с его помощью впервые исследовано влияние различных белковых компонентов крови на выведение магнитных наночастиц из сосудистого русла печени. Также впервые проведено масштабное исследование взаимодействия библиотеки магнитных наночастиц с эритроцитами. Впервые продемонстрировано, что долгая циркуляция частиц в кровотоке и изменение их биораспределения при доставке наночастиц на поверхности эритроцитов могут быть независимыми процессами. Впервые проведено широкое сравнительное исследование долговременной судьбы 17 типов магнитных наночастиц в организме и впервые описано наблюдение полного жизненного цикла магнитных частиц от их введения до полной деградации *in vivo* и связанного с этим воздействия на организм.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что результаты исследования взаимодействия наночастиц с эритроцитами дают представление о влиянии физико-химических параметров наночастиц на их взаимодействие с эритроцитами. Также полученные данные расширяют представления о том, как связывание наночастиц с эритроцитами может влиять на параметры циркуляции и биораспределения магнитных наночастиц. Результаты экспериментов по исследованию биodeградации магнитных наночастиц расширяют представления о долгосрочной судьбе магнитных наночастиц в

организме и дают возможность теоретически оценивать параметры биодegradации аналогичных по своим свойствам магнитных наночастиц.

Практическая значимость исследования обоснована тем, что разработанный способ изучения циркуляции наночастиц в изолированной печени может быть использован для поиска новых подходов к осуществлению связывания и выведения наночастиц из кровотока, а также для разработки новых тераностических наноагентов. Результаты исследования взаимодействия наночастиц с эритроцитами демонстрируют высокий терапевтический потенциал подхода транспорта малоразмерных частиц на клетках крови для создания терапии агрессивных и мелкоклеточных типов рака, и облегчения течения ряда других острых и хронических заболеваний легких. Полученные данные о биодegradации магнитных наночастиц могут быть применимы для теоретической оценки биобезопасности целого ряда магнитных наночастиц на основе магнетита. Также данные об изменении экспрессии железосодержащих белков, увеличении уровня гемоглобина и количества эритроцитов в крови в ответ на биоразложение частиц из оксидов железа могут быть использованы для разработки новых способов управления метаболизмом железа, в частности, для разработки новых высокоэффективных и безопасных способов лечения железодефицитных анемий.

Степень достоверности результатов проведенных исследований сомнений не вызывает. Исследования проведены с помощью современных методов и подходов. Эксперименты выполнены в количестве, достаточном для получения статистически достоверных результатов. Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики в соответствии с числом сравниваемых параметров и нормальным либо ненормальным распределением. Научные положения, выводы и практические предложения построены на основе достоверных результатов исследований, подтвержденных первичной документацией, и согласуются с поставленными целью и задачами работы. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Практические предложения аргументированы. Материал, представленный в работе, согласуется с независимыми данными, опубликованными по тематике, близкой к диссертационной.

Все экспериментальные исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии. Личный вклад диссертанта в представленной работе складывается из непосредственного участия в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертационной работы, проведения молекулярных, клеточных, *in vivo* и иных исследований, компьютерной обработке полученных данных, обосновании полученных результатов, а также в участии в написании и подготовке к публикации статей и тезисов с результатами исследования.

Диссертационный совет 24.1.037.01 постановил, что диссертационная работа Яременко Алексея Владимировича является законченной научно-квалификационной работой, посвященной важным аспектам молекулярной биологии и наномедицины – изучению процессов взаимодействия магнитных наночастиц с организмом, анализу экспрессии железосодержащих белков в ответ на биоразложение наночастиц *in vivo*, влиянию альбуминов на выведение наночастиц из кровотока. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. Таким образом

диссертационная работа Яременко Алексея Владимировича «Определение биodeградации и токсичности магнитных наночастиц в процессах их взаимодействия с организмом» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

- 1) В процессе взаимодействия наночастиц с эритроцитами вы наблюдали образование акантоцитов или для мышинных эритроцитов не характерно?
- 2) Не было ли образование акантоцитов массовым, обвальным процессом?
- 3) Как зависит время полужизни наночастиц от заряда и как можно объяснить тот факт, что в среднем время полужизни положительно заряженных нанонастиц выше, чем у отрицательно заряженных?
- 4) Как вы считаете, при распределении наночастиц по органам печень является неким депо, т.е. наночастицы которые в нее попадают локализуются преимущественно в ней, но при этом могут все же ее покидать и транспортироваться в другие органы, или для наночастиц это путь в один конец и после попадания в органы наночастицы они больше их не покидают и сидят там до конца своей жизни?

Соискатель Яременко А.В. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

- 1) В ходе исследований, проводимых с помощью сканирующей электронной микроскопии, мы действительно видели много видоизмененных эритроцитов, что можно связать с взаимодействием наночастиц с этими эритроцитами, однако специального исследования того, насколько посадка наночастиц на эритроциты изменяет их форму мы не проводили.
- 2) Образование акантоцитов обвальным процессом не было, оно наблюдалось, но большинство эритроцитов все же имели свою типичную дискообразную форму.
- 3) В литературе в целом есть данные о том, что положительные заряженные частицы могут обладать так называемым эффектом протонной и губки. То есть они могут вокруг себя образовывать слой из протонов, который может их в какой-то степени защищать от взаимодействия с белками. И также, возможно, это может их защищать от кислотной деградации в организме. В нашей работе мы объясняли продление жизни наночастиц проявлением данного эффекта.
- 4) Для большинства наночастиц печень, конечно, является конечным депо, в котором они деградируют, однако для части наночастиц печень может быть временным депо. И, например, в нашей работе мы предполагали, что то количество наночастиц, которое мы наблюдаем в селезенке, которое почему-то со временем не падает также так же стабильно, как в печени, может быть связано с тем, что уже после полного выведения магнитных наночастиц они перераспределялись из печени в селезенку, однако для подтверждения данного эффекта надо еще провести дополнительные исследования.

На заседании 18.01.2023 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по исследованию биологических процессов взаимодействия магнитных наночастиц с белками крови, эритроцитами, и органами, а также изучению влияния биодegradации магнитных наночастиц на метаболизм железа в организме, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии и наномедицины, присудить Яременко Алексею Владимировичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 - Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

19 января 2023 г.

