

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Е. С. Корниловой
на диссертацию Авдеевой Елены Сергеевны
«ДОСТАВКА БИОМОЛЕКУЛ В КЛЕТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЛОЕВ
НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ»,
представленной на соискание степени ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Актуальность темы исследования. В последние годы использование наноструктур различных типов для диагностики и терапии социально значимых заболеваний привлекает интерес широкого круга ученых. Одним из основных стимулов подобных работ является разработка адресной доставки лекарств, или, напротив, ядов или фотосенсибилизаторов в поврежденные клетки. Очевидно, что идея «исправлять» клеточные дефекты с помощью введения «правильных» генов или репрограммировать клетки очень привлекательна. К сожалению, метод редактирования генома CRISPR/Cas9 также имеет ряд недостатков. Подобные задачи решаются в большинстве своем использованием различных трансфектантов, нагруженных плазмидами, либо электропорацией в разных вариантах, однако методы эти часто плохо переносятся клетками и демонстрируют низкую эффективность. Целый ряд клеточных линий, как справедливо замечает автор, являются «трудно трансфицируемыми». Существенно, что именно к таким клеткам относятся стволовые, как мезенхимные, так и эмбриональные, и iPS. Учитывая, какие надежды возлагаются на клеточную терапию, разработка методов, позволяющих эффективно, воспроизводимо и относительно безболезненно для клеток проводить подобные манипуляции, несомненно является актуальной. В настоящий момент такие методы чрезвычайно важны и для исследователей, занимающихся изучением фундаментальных аспектов жизнедеятельности клеток.

Научная новизна. Отсутствие единой унифицированной технологии доставки внутрь клеток различных агентов, в том числе, ДНК, приводит к неоднозначности интерпретации получаемых в разных лабораториях мира результатов, это особенно касается стволовых клеток. Кроме того, не все клетки поддаются традиционной трансфекции, а методы могут быть достаточно токсичны. Появление относительно простой системы трансфекции, которую возможно оптимизировать под свойства конкретных клеток, является несомненным шагом вперед. В своей работе Е.С.Авдеева предлагает и экспериментально обосновывает технологию оптопорации на основе новой платформы из золотых наночастиц с ПР разной геометрии, иммобилизованных на подложке и показывает, что как эффективность введения экзогенных молекул и частиц, так и выживаемость клеток после лазерного облучения гораздо выше 80%. Это существенно превышает результаты, достигаемые с помощью химических трансфектантов. Элегантность подхода заключается еще и в том, что авторы как бы перевернули с головы на ноги традиционную парадигму использования НЧ, при которой именно наночастицы, нагруженные какими-то макромолекулами, добавляются к иммобилизованным или суспензионным клеткам, что порождает массу побочных и весьма небезопасных проблем, при этом возжеленная «адресность» доставки пока является светлой мечтой на горизонте. В данной же работе стабилизированные, иммобилизованные на подложке ЗНЧ, обладающие плазмонным резонансом, на которых вырабатываются клетки, используются наиболее эффективно для решения актуальных, достижимых «здесь и сейчас» задач.

Достоверность полученных результатов основана на глубоком понимании физики процессов и их применения к живым объектам, и подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и соответствием их теоретическим

расчетам, большими выборками анализируемых объектов и корректным применением статистического анализа данных.

Основные подходы и результаты исследования. Диссертация построена по традиционному принципу, и кроме ключевых вводных частей, обосновывающих цель работы и ее задачи, включает обзор литературы, описание материалов и методов, изложение результатов с их обсуждением, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

В **Обзоре литературы** автор концентрируется на существующих методах трансфекции, их плюсах и минусах, а также на механизмах проникновения экзогенных макромолекул в клетки при их использовании. Для анализа привлечены 289 литературных источников. Обзор (как, впрочем, и вся диссертация) хорошо написан и достаточно полно освещает проблему. Единственное замечание связано с тем, что деление эндоцитоза на фагоцитоз и пиноцитоз слишком упрощенно, постольку под пиноцитозом все же понимают пассивное поглощение внеклеточной среды со всеми содержащимися в ней компонентами, тогда как клатрин-опосредованный эндоцитоз – наиболее высокоспецифичный путь входа лигандов, рецепторы к которым локализируются на плазматической мембране. С помощью этого пути клетка способна реагировать на молекулы, присутствующие в окружающей среде в пико- и даже фемтомольных концентрациях. Это, впрочем, не отменяет того факта, что часть внеклеточной среды все равно захватывается при формировании такой эндосомы.

Обзор завершается пунктом 1.5 под названием **«Постановка задач исследования»**. Очевидно, что этот пункт подводит итог анализу существующих техник и технологий и показывает логику работы. Хочется подчеркнуть, что с точки зрения именно логики исследования, набора контролей, примененных методов анализа, сравнения теории с практикой эта работа производит чрезвычайно сильное впечатление своей системностью и комплексностью.

Это впечатление усиливает знакомство с разделом **«Материалы и методы»**. В нем подробно описан широкий спектр методов, как химических и физических, так и клеточно-биологических, от синтеза, функционализации и характеристики ЗНЧ, приготовление и характеристика слоев ЗНЧ, наработки препаратов плазмидной ДНК методом молекулярного клонирования до культивирования клеток, подготовки и проведения оптопорации клеток на слоях ЗНЧ, оценки ее эффективности и оценки жизнеспособности клеток, апробации метода на примере культивируемых клеток нескольких линий. Нельзя также не отметить применение атомно-силовой микроскопии для оценки свойств оптопорированных клеток и изучения вопроса о восстановлении клеток после процедуры.

В **главе 3** Е.С.Авдеева описывает результаты экспериментов по получению и характеристике монослоев золотых наночастиц разной геометрии (звезды, стержни и сферы) с точки зрения их размеров и других характеристик, равномерности покрытия субстрата, величины адсорбции, плотности упаковки частиц в слое. Проводится оценка параметров биосовместимости слоев ЗНЧ и лазерного облучения, приводятся данные, подтверждающие сохранение плазмонных свойств НЧ (что полностью исключает открепление частиц и взаимодействие/проникновение в клетки). Показано, что ни стерилизация 70% этанолом, ни УФ-кварцевание планшетов со слоями НЧЗ перед посадкой клеток также не оказывали на слои никакого влияния, что очень существенно с точки зрения практического применения этой технологии. Все полученные результаты для HeLa были повторены и для нескольких других линий. Тесты на морфологию клеток, на «живые\мертвые» и на дыхательную активность показали высокую степень биосовместимости слоев ЗНЧ и культивируемых не них клеток. Тщательность подходов в данной части делает достоверными результаты последующих экспериментов.

Глава 4 посвящена оптимизации рабочих параметров процедуры оптопорации. Приведены схемы экспериментов в двух вариантах - облучения непрерывным лазером и

облучения в импульсном режиме. В обоих случаях оценены интенсивность и длительности облучения, результативность оценивалась по поступлению иодида пропидия (ПИ). В качестве контроля использовали наносферы, не поглощающие на длине волны 800 нм. Сделан вывод, что наиболее перспективными являются платформы на основе нанозвезд (ЗНЗ) и что эффект связан не просто с лазерным облучением, а именно с процессом плазмонного резонанса.

В главе 5 диссертант тестирует полученный протокол для двух случаев: входа флуоресцентно-меченых декстранов разного размера и возможности трансфекции клеток HeLa с помощью плазмидных ДНК. В обоих случаях получен положительный результат, но очевидно, что импульсный протокол является и более эффективным, и более щадящим. Технология оптопорации клеток, выращенных на слоях ЗНЗ-800, успешно сработала и на таких плохо поддающихся традиционным методам трансфекции клетках, как A431. Для контроля приведено сравнение обработки клеток липофектамином., продемонстрировавшим и меньшую эффективность, и большую цитотоксичность. Возможность временной трансфекции клеток HeLa плазидами, несущими гены флуоресцентных белков или люциферазы, была подтверждена как визуальным микроскопическим методом, так и ПЦР.

В главе 6 рассматриваются связь плазмонных свойств слоев ЗНЧ с эффективностью оптопорации. Показано, что как лазерное облучение клеток вне области плазмонного резонанса НЧ, так и в отсутствие слоя ЗНЧ не приводит к снижению проницаемости мембран. Далее рассматривается обнаруженный феномен длительного восстановления функциональной целостности клеток после оптопорации, которые оказались на удивление длительными. Действительно, нормальная клетка обладает механизмами «заживления» повреждений мембраны, и делает это достаточно быстро, в течение максимум десятков минут, тогда как в экспериментах автор наблюдал возможность проникновения экзогенных макромолекул в течение более чем 24 ч. Теоретически, за это время поврежденная клетка может потерять практически всю цитоплазму, и, возможно, часть органелл. Елена Сергеевна высказывает предположение, что крупные повреждения репарируются быстрее и в то время как мелкие «дырочки» существуют дольше. Можно посоветовать автору, имеющему в руках такой инструмент, как флуоресцентные декстраны разного размера, в дальнейшем выяснить сравнительную динамику доступности клеток для таких объектов. Вторым возможным объяснением является длительное восстановление кортикального актина. Эта возможность, с моей точки зрения, не исключена, но следует учитывать, что реорганизации цитоскелета, как правило, очень быстрый процесс. Мне кажется, что наиболее разумной причиной неторопливого восстановления клеток может быть все же длительность пребывания в состоянии с поврежденными мембранами, этого времени достаточно, чтобы потерять значительные количества как цитоплазматических белков, в том числе компонентов цитоскелета, так и мелких мембранных структур, на восстановление которых до оптимального уровня требуется запуск синтеза *de novo* белков и липидов.

Приведенные выше рассуждения носят очевидный дискуссионный характер, даже не являясь замечаниями как таковыми. Диссертация Е.С. Авдеевой несомненно принадлежит к редкому классу работ, в которых биологическая задача решается на прекрасной физической базе, и по системности, комплексности и результативности заслуживает самой высокой оценки. Апробированные в работе технологии могут быть чрезвычайно востребованы в фундаментальной биологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Авдеевой Елены Сергеевны «ДОСТАВКА БИМОЛЕКУЛ В КЛЕТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЛОЕВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И ИНФРАКРАСНОГО ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ», представленную на соискание степени

ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной автором самостоятельно на высоком научном и методическом уровне. В диссертации содержится решение задачи, имеющей важное значение для создания унифицированных высокоэффективных и нетоксичных протоколов трансфекции клеток на основе слоев золотых наночастиц, которые могут быть оптимизированы с учетом свойств конкретных клеток. Полученные данные могут быть рекомендованы к использованию в соответствующих курсах, читаемых на биологических факультетах классических университетов и в медицинских вузах, а так же к применению в лабораториях.

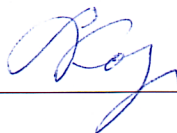
Диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакции от 01.10.2018), а ее автор Авдеева Елена Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент

Главный научный сотрудник,

руководитель лаборатории динамики внутриклеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук,

доктор биологических наук (03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология), профессор



Корнилова Елена Сергеевна

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

+7(812) 297-18-29, +7 (812) 297-18-34

cellbio@incras.ru

<https://www.incras.ru>

17.05.2021

