

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования

«Приволжский исследовательский
медицинский университет»

Министерства здравоохранения
Российской Федерации

(ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России)

Минина и Пожарского пл., 10/1,
г. Нижний Новгород, 603950, БОКС-470
тел.: (831) 422-12-50; факс: (831) 439-01-84
<http://pimunn.ru/>

e-mail: rector@pimunn.ru

ОКПО 01963025, ОГРН 1025203045482

ИНН/КПП 5260037940/526001001

«УТВЕРЖДАЮ»



Проректор по научной работе
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Приволжский
исследовательский медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук

 А.С. Благонравова

12 МАЙ 2021

№ 5/к

« 12 » мая 2021 г.

На № _____ от _____

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Авдеевой Елены Сергеевны

на тему «**Доставка биомолекул в клетки с использованием слоев**

наночастиц золота и инфракрасного лазерного облучения»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.02 Биофизика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Авдеевой Елены Сергеевны посвящена разработке и изучению новой технологии для доставки нуклеиновых кислот в клетки. Ключевые аспекты, связанные с процессами прохождения целевых агентов сквозь клеточную мембрану, весьма многогранны. Модифицированные клетки, полученные путем доставки и экспрессии генетического материала, служат объектами для широкого круга фундаментальных и прикладных исследований современной биомедицины, биотехнологии и других областей. В настоящее время разработано достаточное количество методов и инструментов для внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот. Тем не менее, открытыми остаются вопросы, связанные с низкой эффективностью трансфекции, цитотоксичностью используемых

носителей и ограниченными возможностями изменения протокола трансфекции с целью оптимизации под различные типы клеток и тканей. Диссертация Е.С. Авдеевой посвящена решению задачи разработки и оптимизации процедуры оптопорации клеток животных с помощью плазмонных наночастиц золота и лазерного излучения. В частности, в работе изучена динамика морфологических и физиологических свойств клеток, выращенных на слоях наночастиц золота с варьирующими параметрами при воздействии непрерывного и импульсного лазерного облучения; проведена оптимизация режимов облучения и параметров ассемблированных наночастиц; оценены показатели эффективности доставки и жизнеспособности клеток; а так же изучены биофизические механизмы, лежащие в основе разработанной системы оптопорации.

С учетом вышесказанного, актуальность работы Е.С. Авдеевой не вызывает сомнений.

Научная новизна

В представленной работе предложена оригинальная система для оптопорации клеток млекопитающих на основе слоев плазмонных наночастиц золота разной геометрии с применением непрерывного или импульсного лазерного излучения. Проведено сравнение эффективности разработанной системы и коммерческих химических агентов для доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих. Впервые изучены механизмы, лежащие в основе плазмонной оптопорации клеток на слоях наночастиц золота, проверены гипотезы поведения отдельных компонентов системы.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 137 страницах и включает традиционные разделы: введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, четыре главы с представлением результатов и их

обсуждением, заключение, выводы и список использованной литературы, включающий 289 источников.

Во введении определены цель и задачи исследования, а также новизна, фундаментальная и практическая значимость работы.

Обзор литературы состоит из пяти частей. Автор анализирует данные о современном состоянии технологий для генетического перепрограммирования клеток. Представлен обзор данных последних пяти лет о существующих методах внутриклеточной доставки генетического материала, их преимуществах и ограничениях на пути к внедрению в клиническую и лабораторную практику; индивидуальных параметрах клеток-мишеней, доставляемых функциональных нуклеиновых кислот, и механизмах их взаимодействия. Автор уделил большое внимание рассмотрению оригинальных систем доставки на основе плазмонно-резонансных наночастиц, в том числе в комбинации с лазерным облучением, что непосредственно связано с темой диссертационной работы.

Материал, собранный и проанализированный Е.С. Авдеевой в главе “Обзор литературы” подтверждает актуальность выбранной темы диссертации.

Обзор литературы написан достаточно хорошим языком, современен и касается тех проблем, которые имеют прямое отношение к теме диссертационной работы. Грамотный и тщательный анализ литературных данных обуславливает убедительность цели и задач работы, поставленных ее автором.

В главе 2 соискатель подробно описывает использованные при выполнении работы методы и подходы, а также оборудование и реактивы. Обращает на себя внимание обширный набор и комплементарность используемых методов, включающих как современные технологии, так и стандартные общепринятые методики.

Глава 3 посвящена изложению результатов о разработанной технологии получения слоев наночастиц золота, основанной на центрифугировании, детальным оптическим и микроскопическим характеристикам

синтезированных коллоидов и ассемблированных наночастиц. В этой же главе представлены результаты тестирования биосовместимости слоев наночастиц золота в отношении модельных клеточных линий.

Полученные данные позволяют сделать вывод о получении биосовместимых слоев наночастиц, имеющих контролируемые физико-химические параметры (плотность упаковки, равномерность слоя, коэффициент поглощения света слоем наночастиц золота, природа субстрата) с применением разработанной универсальной технологии.

Глава 4 посвящена изложению результатов изучения автором детальной оптимизации процедуры оптопорации: параметров слоев наночастиц золота и режимов облучения непрерывным и импульсным лазерами. Согласно полученным данным, при оптопорации на слоях наночастиц золота происходит кратковременное увеличение проницаемости мембран клеток за счет локального нагрева наночастиц под воздействием лазерного облучения с длиной волны, частично или полностью перекрывающейся с длиной волны плазмонного резонанса.

Выявлено, что наиболее эффективными платформами для оптопорации являются слои золотых нанозвезд с плазмонным резонансом 800 нм с удельным содержанием Au ~ 15 мкг/см². Оптимальный температурный диапазон при облучении клеток HeLa непрерывным 808-нм лазером соответствовал 42-45 °С при постоянной энергии облучения – 25 Дж (плотность мощности 1 Вт/см², время воздействия – 40-50 с, площадь облучаемой поверхности 0.5 см²). Оптимальные параметры импульсного 1064-нм лазера в режиме 2-D сканирования соответствовали скорости сканирования 0.05 м/с, энергии импульса 1.5 мкДж при длительности и скважности импульса 200 нс и 10 кГц, соответственно.

Глава 5 посвящена апробации разработанной системы для внутриклеточной доставки модельных непенетрирующих агентов и ДНК-плазмид в культуры клеток HeLa и A431, и сравнению эффективностей доставки и жизнеспособности клеток с коммерческими липокатионными

агентами. В соответствии с результатами исследования разработанная и оптимизированная система оптотрансфекции импульсным лазером на слоях золотых нанозвезд с плазмонным резонансом 800 нм имеет более высокие показатели эффективности и жизнеспособности клеток для доставки плазмид в клетки HeLa и «трудно трансфицируемые» клетки линии A431 по сравнению с коммерческими агентами для трансфекции. Получены данные, свидетельствующие о более эффективной стабильной трансфекции клеток HeLa, при этом средняя выживаемость оптопорированных трансфектантов была выше на 30%, чем при трансфекции липокатионами.

Глава 6 посвящена исследованию механизмов оптопорации клеток на слоях наночастиц золота, а также особенностей восстановления мембран после процедуры и механических свойств клеток, адсорбированных на слоях наночастиц, методами прижизненной зондовой и флуоресцентной микроскопии. Результаты проведенных исследований позволяют сделать выводы о полном восстановлении клеток HeLa после оптопорации непрерывным и импульсным лазером, в течение 30 ч и 5 ч, соответственно.

Представленная информация убедительно свидетельствует о достоверности полученных результатов и дает обоснование для представления данной работы по специальности 03.01.02 Биофизика.

В разделах “Заключение” и “Выводы” обобщены полученные экспериментальные данные, обоснованы основные положения работы и сформулированы выводы, которые в полной мере соответствуют поставленным задачам.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационное исследование Авдеевой Елены Сергеевны, безусловно, имеет высокую научную и практическую ценность. Полученные соискателем результаты дополняют фундаментальные представления о механизмах оптопорации клеток млекопитающих в условиях клеточной культуры и определяют ключевые параметры, от которых зависит эффективность

внутриклеточной доставки целевых агентов. Практическая значимость полученных результатов определяется широкой распространенностью генетически-модифицированных клеточных линий в биомедицинских исследованиях, а также потенциалом применения разработанной системы оптопорации клеток на слоях наночастиц золота в практике. Полученные автором диссертации результаты несут высокую значимость для развития новых биофизических методов генетической модификации клеток и тканей и генной терапии. Разработанная в диссертационной работе технология может найти применение в области генной терапии, клеточной инженерии, регенеративной медицины, молекулярной биологии и фармакологии. Результаты диссертационной работы Авдеевой Е.С. могут быть рекомендованы к применению в научных и научно-образовательных учреждениях, использующих методы генной инженерии.

Обоснованность выводов

Использование соискателем современных биофизических, химических, физиологических и биохимических методов исследования и адекватных статистических методов для обработки экспериментальных данных подтверждает достоверность результатов, представленных в диссертационной работе Авдеевой Елены Сергеевны, а также сделанных выводов и выносимых на защиту положений.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в автореферате и публикациях автора. Всего по теме диссертации опубликовано 14 научных работ. Из них 4 статьи в журналах из перечня, рекомендуемого ВАК, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и РИНЦ. Рукопись автореферата соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

Принципиальных замечаний к рецензируемой диссертационной работе нет. Имеются замечания по использованию ряда терминов. Так автор использует термины «респираторный тест» и «дыхательная активность» в отношении МТТ-теста, который по сути отражает метаболическую активность клеток и, следовательно, их жизнеспособность. Поскольку восстановление МТТ-красителя связано не только с митохондриальным дыханием, но также с цитоплазматическими ферментами и другими органеллами, использование этих терминов не совсем корректно. Можно также отметить наличие в тексте работы «англицизмов», например, слово «непенетрирующий» можно заменить на русский аналог «непроникающий». Кроме того, в тексте диссертационной работы встречаются стилистические и грамматические ошибки.

Однако все представленные замечания не снижают научно-практической значимости и общего положительного впечатления от диссертационной работы Е.С. Авдеевой.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Представленные к защите результаты диссертационного исследования свидетельствуют о высокой квалификации ее автора – Авдеевой Елены Сергеевны. Выбранная стратегия исследования корректна и логически последовательна. В целом диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне. Грамотная интерпретация полученных результатов и сформулированные выводы свидетельствуют о понимании соискателем биофизических принципов и особенностей взаимодействия золотых наночастиц с биосистемами. Все это позволяет говорить о соответствии соискателя Авдеевой Елены Сергеевны ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 «Биофизика», на которую претендует автор.

Заключение

Диссертационная работа Авдеевой Елены Сергеевны на тему “Доставка биомолекул в клетки с использованием слоев наночастиц золота и инфракрасного лазерного облучения” является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение. Представленная к защите диссертация соответствует требованиям ВАК п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (ред. от 01.10.2018, с изм. от 26.05.2020), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам автор Е.С. Авдеева заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 «Биофизика».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (протокол № 4 от 20 апреля 2021 г.).

Заместитель директора по науке
НИИ экспериментальной онкологии
и биомедицинских технологий
ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава
России, кандидат биологических
наук (03.00.13 – Физиология,
03.00.02 – Биофизика)


Марина Вадимовна Ширманова

Подпись М.В. Ширмановой

Ученый секретарь ФГБОУ
«ПИМУ» Минздрава России


Наталья Николаевна Андреева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России)

Минина и Пожарского пл., 10/1, г. Нижний Новгород, 603950, БОКС-470

тел.: (831) 422-12-50; факс: (831) 439-01-84

<http://pimunn.ru/>

e-mail: rector@pimunn.ru