

Протокол № 99
заседания диссертационного совета Д 212.038.03 по защите
кандидатской диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
от 03.06.2021 г.

Состав диссертационного совета утвержден в количестве 19 человек.

Присутствовало на заседании 14 человек, в том числе по специальности – 5 докторов наук.

Председатель: д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич

Присутствовали: д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич, д.м.н., профессор Алабовский Владимир Владимирович, д.б.н., профессор Вашанов Геннадий Афанасьевич, д.б.н., профессор Грабович Маргарита Юрьевна, д.б.н., профессор Епринцев Александр Трофимович, д.б.н., профессор Ершова Антонина Николаевна, д.б.н., профессор Калаев Владислав Николаевич, д.б.н., профессор Корнеева Ольга Сергеевна, д.б.н., профессор Наквасина Марина Александровна, д.б.н., профессор Пашков Александр Николаевич, д.б.н., профессор Попов Василий Николаевич, д.б.н., профессор Попова Татьяна Николаевна, д.б.н., профессор Путинцева Ольга Васильевна, д.б.н., доцент Холявка Марина Геннадьевна.

Официальные оппоненты:

- Корнилова Елена Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, лаборатория динамики внутриклеточных мембран, главный научный сотрудник – присутствовала.

- Ломова Мария Владимировна, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», кафедра физики полупроводников факультета нано- и биомедицинских технологий, доцент – присутствовала.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПИМУ).

Слушали: защиту диссертационной работы Авдеевой Елены Сергеевны на тему: «Доставка биомолекул в клетки с использованием наночастиц золота и инфракрасного лазерного облучения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Вопросы по защищаемой диссертации задали: д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич, д.м.н., профессор Алабовский Владимир Владимирович, д.б.н., доцент Наквасина Марина Александровна, д.б.н. Сурин Александр Михайлович.

В дискуссии приняли участие: д.б.н., профессор Артюхов Валерий Григорьевич, д.м.н., профессор Алабовский Владимир Владимирович, д.б.н., доцент Наквасина Марина Александровна, д.б.н. Сурин Александр Михайлович.

Постановили: на основании протокола № 1 заседания счетной комиссии считать, что диссертация Авдеевой Елены Сергеевны отвечает всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика.

Результаты голосования: «за» – 14, «против» – нет, недействительных бюллетеней – нет (протокол счетной комиссии прилагается).

Стенограмма и заключение диссертационного совета прилагаются.

Председатель диссертационного
совета

Д 212.038.03

д.б.н., профессор

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.б.н., профессор



Артюхов В.Г.

Грабович М.Ю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 212.038.03, СОЗДАННОГО НА
БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
“ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ”, МИНОБРНАУКИ
РОССИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 03.06.2021 № 99

О присуждении Авдеевой Елене Сергеевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация “Доставка биомолекул в клетки с использованием слоев наночастиц золота и инфракрасного лазерного облучения” по специальности 03.01.02 – биофизика принята к защите 31.03.2021 г., протокол № 96, диссертационным советом Д 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», Минобрнауки России, 394018, г. Воронеж, Университетская площадь, 1; приказ №717/нк от 09.11.2012.

Соискатель Авдеева Елена Сергеевна, 1992 года рождения, работает младшим научным сотрудником в лаборатории нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

В 2014 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского по специальности 020801 “Экология”.

В 2020 году окончила очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук по направлению подготовки 06.06.01 “Биологические науки”.

Диссертация выполнена в лаборатории нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, Пылаев Тимофей Евгеньевич, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт

биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, лаборатория нанобиотехнологии, научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

- Корнилова Елена Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, лаборатория динамики внутриклеточных мембран, главный научный сотрудник.

- Ломова Мария Владимировна, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», кафедра физики полупроводников факультета нано- и биомедицинских технологий, доцент.

- дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПИМУ), г. Нижний Новгород в своем положительном заключении, подписанным кандидатом биологических наук, заместителем по науке НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПИМУ) Ширмановой Мариной Вадимовной, указала, что диссертационное исследование Авдеевой Е.С. является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение, в которой содержится решение актуальных задач, связанных с разработкой и оптимизацией универсальной системы оптопорации на основе плазмонных субстратов и лазерного облучения. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.02. – Биофизика и 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 – Авдеева Елена Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02. – Биофизика.

Соискатель имеет 14 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации опубликовано 4 работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 2 работ.

Все работы посвящены исследованию влияния физико-химических параметров слоев НЧЗ и режимов лазерного облучения на морфофизиологические показатели клеток, а также оптимизации протоколов тестов дыхательной активности животных клеток. Авторский вклад составляет 90 %. Общий объем – 2.2 печ. л.

Наиболее значительные научные работы:

1. Pylaev T.E, Vanzha E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers // J biophoton. 2018. Art No. e201800166. doi:10.1002/jbio.201800166.
2. Pylaev T.E., **Avdeeva E.S.**, Khlebtsov B.N., Zakharevich A., Khlebtsov N.G. A novel centrifuge-based approach for tunable 2D layering of plasmonic nanoparticles // Proc. SPIE. 2018. Art No. 10336 (pp. 1-6). doi:10.1117/12.2522135.

На диссертацию и автореферат поступило 9 положительных отзывов от 1) Полуконовой Н.В., д.б.н., профессора, ответственной за научную работу кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2) Пышной И.А., к.х.н., старшего научного сотрудника лаборатории биомедицинской химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии; 3) Синдеевой О.А., к.б.н., научного сотрудника лаборатории биоматериалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования "Сколковский институт науки и технологий; 4) Мелентьева П.Н., к.ф.-м.н., доцента, старшего научного сотрудника базовой кафедры квантовой оптики и нанофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт спектроскопии Российской академии наук; 5) Замай Т.Н., д.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Миздрава России; 6) Кайдашева В.Е., к.ф.-м.н., старшего научного сотрудника лаборатории оптоэлектроники двумерных материалов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский

университет)»; 7) Никитина М.П., к.ф.-м.н., старшего научного сотрудника лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук; 8) Дзантиева Б.Б, д.х.н., профессора, руководителя отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики, заведующего лабораторией иммунобиохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН); 9) Хрустальной Л.И., д.б.н., профессора, руководителя центра молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

Все отзывы положительные, в них отмечается актуальность работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов. Замечания носят рекомендательный и уточняющий характер.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их компетентностью по тематике диссертационного исследования, наличием публикаций по данной тематике в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК Минобрнауки России, содержанием диссертационной работы и формулой паспорта специальности «03.01.02 – Биофизика».

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложен новый подход для получения биосовместимых слоев наночастиц золота (НЧЗ) с контролируемыми физико-химическими параметрами;

изучены механизмы плазмонной оптопорации клеток на платформах слоев НЧЗ и проверены гипотезы относительно поведения отдельных компонентов системы; **доказано**, что кратковременное увеличение проницаемости мембран клеток при оптопорации на слоях НЧЗ происходит, в том числе, за счет локального нагрева частиц под воздействием лазерного излучения с длиной волны, частично или полностью перекрывающейся с длиной волны плазмонного резонанса;

выявлены наиболее эффективные платформы для оптопорации, представленные слоями золотых нанозвезд с плазмонным резонансом в области 800 нм;

оптимизированы параметры слоев НЧЗ и режимы облучения животных клеток двумя источниками лазерного излучения для эффективной доставки непроникающих агентов и модельных плазмид в клетки HeLa;

показано существенное преимущество перед коммерческими трансфицирующими агентами для доставки плазмид в «трудно трансфицируемые» клетки линии A431 и получения модифицированных клеток HeLa со стабильной экспрессией целевого продукта;

выявлено, что длительность полного самовосстановления клеток HeLa после оптопорации непрерывным и импульсным лазером происходит в течение длительных промежутков времени, характерных для процессов регенерации живых клеток в ответ на стрессовое воздействие лазерного облучения.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения диссертационной работы: слои золотых нанозвезд с длиной волны плазмонного резонанса в области 800 нм являются наиболее эффективными платформами для оптопорации клеток как непрерывным, с длиной волны излучения 808 нм, так и импульсным лазерами, с длиной волны излучения 1064 нм. Настройка системы оптопорации под конкретные особенности клеток осуществляется путем регулировки режимов облучения и параметров слоев НЧЗ. Сравнительная количественная оценка эффективности доставки плазмидной ДНК и жизнеспособности клеток эпидермальной карциномы человека A431 при оптотрансфекции импульсным лазером показала значительное преимущество разрабатываемой системы перед коммерческим трансфицирующим агентом Липофектаминол 2000. Показано, что полное восстановление морфофункциональных показателей и непроницаемости мембран при оптопорации клеток HeLa на слоях НЧЗ непрерывным либо импульсным лазером происходит в течение 30 ч и 5 ч, соответственно, что характерно для процессов регенерации живых клеток в ответ на стрессовое воздействие лазерного облучения.

Применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов)

изучены механизмы, лежащие в основе плазмонной оптопорации клеток на платформах слоев НЧЗ, и **проверены** рабочие гипотезы поведения отдельных компонентов системы;

разработана и оптимизирована экспериментальная схема для оптопорации животных клеток на слоях плазмонных НЧЗ разной геометрии с применением непрерывного или импульсного лазерного излучения;

оценены перспективы разработанной технологии для эффективной доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих в сравнении с коммерческими химическими агентами.

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

разработана новая система оптопорации клеток на слоях НЧЗ для применения в лабораторной и клинической практике;

определены возможности практического использования полученных результатов, которые могут служить основой для разработки новых подходов в области генной терапии, клеточной инженерии, регенеративной медицины, молекулярной фармакологии и пр.

создана гипотетическая модель для прижизненного изучения морфофункциональных показателей мембран и процессов регенерации клеток в ответ на стрессовое воздействие лазерного облучения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты воспроизводимы, получены на сертифицированном оборудовании, подвергнуты статистической обработке при использовании лицензионных компьютерных программ;

теория построена на новых экспериментальных данных и согласуется с опубликованными экспериментальными результатами по внутриклеточной доставке биомолекул с применением лазерного излучения и плазмонных наночастиц;

идея базируется на анализе полученных экспериментальных данных и практике мирового опыта по изучению проблемы внутриклеточной доставки целевых молекул;

использованы сравнения авторских результатов и данных, полученных ранее при изучении эффектов лазерного облучения, опосредованного наночастицами золота, на проницаемость клеточных мембран;

установлено, что полученные автором результаты согласуются с имеющимися данными по изучению особенностей оптопорации клеток с применением плазмонных наночастиц;

использованы современные методики сбора и математической обработки исходной информации, обоснован подбор объектов наблюдения и измерения.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии автора в разработке программы исследований, постановке и проведении лабораторных экспериментов, статистической обработке и интерпретации экспериментальных данных по синтезу и асемблированию наночастиц, поддержанию и культивированию животных клеток, оптопорации на слоях НЧЗ, качественной и количественной оценке результатов оптотрансфекции, и подготовке основных публикаций по выполненной работе.

Материалы диссертации были доложены: на Всероссийских и Международных научно-практических конференциях.

Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной задачи и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается наличием последовательного плана исследования, непротиворечивой методологической платформой, концептуальностью и взаимосвязью выводов.

Диссертация, представленная на соискание кандидата наук, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, состоящей в разработке и оптимизации системы оптопорации с использованием плазмонных наночастиц золота разной геометрии и двух типов лазерного облучения.

В диссертации Авдеевой Е.С. соблюдены установленные Положением о присуждении ученых степеней критерии, которым должна отвечать диссертация на соискание ученой степени кандидата наук.

В диссертации Авдеевой Елены Сергеевны отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 03.06.2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Авдеевой Е.С. ученую степень кандидата биологических наук

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 5 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав совета, проголосовали «за» – 14, «против» – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета

Д 212.038.03

д.б.н., профессор



Артюхов Валерий Григорьевич

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.б.н., профессор

Грабович Маргарита Юрьевна

3 июня 2021 г.