

УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора Федерального  
государственного учреждения науки  
Института теоретической и  
экспериментальной биофизики  
Российской академии наук, д.б.н.,  
проф. И.П. Белецкий



12 ноября 2015 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

о научно-практической ценности диссертации Шубенкова Александра Николаевича «Эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

#### Актуальность темы диссертационного исследования.

Исследование цитотоксических свойств наноматериалов в настоящее время весьма актуально в виду наращивания темпов их разработки, производства и использования. Уникальные свойства наночастиц открывают новые широкие возможности для биотехнологии и медицины, что в свою очередь ставит множество задач по исследованию их биологических свойств. Это необходимо как для оценки свойств вновь полученных наночастиц, так и для накопления знаний о том, как строение наночастиц влияет на их биологические свойства при создании наноматериалов с прогнозируемыми характеристиками и разработки методов тестирования вновь полученных материалов.

Область изучения токсических свойств наночастиц (НЧ) и применения наноматериалов в биотехнологии и медицине на данный момент находится в стадии

активного развития. Еще не до конца отработаны методы исследования биологических свойств наноматериалов, результаты, полученные для идентичных наноматериалов нередко противоречивы. Таким образом, в связи с вышеизложенным, тема диссертационного исследования представляется своевременной и актуальной.

**Связь темы диссертации с планами отраслей биологических наук**

Диссертация Шубенкова А.Н. выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 11-02-12210-офи-м и 14-04-00933-а в рамках перечня критических технологий РФ – клеточных технологий.

**Новизна исследования и полученных научных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Экспериментальные исследования выполнены с использованием современных методов и в достаточном объеме, что позволило автору установить ряд важных закономерностей и положений, отличающихся оригинальностью и новизной. В частности, в процессе проведения исследования показана хорошая степень биосовместимости НЧ Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO<sub>2</sub>, что доказывает их перспективность для использования в биотехнологии. Не выявлено цитотоксических свойств всех исследованных НЧ. Однако показано, что в отношении клеток различного типа исследованные НЧ способны проявлять различные биологические эффекты, которые можно модулировать путем модификаций НЧ.

Также при анализе взаимодействия всех использованных НЧ с мононуклеарами периферической крови человека были подтверждены данные ранее проведенных исследований, где показано увеличение уровня активных форм кислорода при инкубации клеток с НЧ различного типа (металлсодержащих, органических). Однако в плане продукции активных форм кислорода под воздействием наноматериалов получены и новые данные. Так, в случае с мезенхимальными стромальными клетками не наблюдалось увеличения уровня активных форм кислорода, а инкубация мезенхимальных стромальных клеток с НЧ Si/B и Si/Ag приводила к его понижению. Сделан важный вывод о том, что увеличение уровня активных форм кислорода не является обязательным условием активации внутриклеточных механизмов клеточной гибели при взаимодействии с НЧ.

Влияние на внутриклеточные органеллы оказалось разнонаправленным. Выявлено как повышение, так и снижение активности таких органелл как митохондрии и лизосомы. Эти эффекты зависели как от модификации НЧ, так и от типа используемых клеток. При этом выявлена способность НЧ Si стимулировать пролиферацию фетальных фибробластов человека, что свидетельствует о нормальном протекании основополагающих клеточных процессов.

Выявлены свойства НЧ, которые в будущем могут быть использованы в терапии онкологических заболеваний, к примеру, для НЧ Si/V впервые получены данные, свидетельствующие в пользу их способности поглощаться клетками, что важно для использования их в бор-нейтронзахватной терапии. При анализе светорассеяния показано, что данные НЧ либо оседали на мембране, либо проникали в клетку, что согласуется с изменением жесткости клеточной мембраны, также показанной для данных НЧ.

В результате проведенной работы сделан вывод о высокой степени биосовместимости НЧ чистого кристаллического кремния и его модификаций. Доказано, что модификация таких НЧ благородными металлами способна изменять характер их взаимодействия с клетками разных типов.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационная работа Шубенкова А.Н. выполнена на значительном объеме экспериментальных данных. Обосновано использование примененных клеточных моделей, а также метода оценки *in vitro* цитотоксичности, внимание сосредоточено на рассмотрении наиболее существенных показателей таких как апоптоз, некроз, пролиферация, уровень активных форм кислорода, состояние митохондрий и лизосом.

Цель и задачи исследования сформулированы автором конкретно и четко и являются логичным следствием аналитического обзора большого количества зарубежных и отечественных источников литературы по изучаемой проблеме и отражают ее актуальность.

Поставленные в работе задачи решены на хорошем научно-методическом уровне с использованием как проверенных временем классических методов, так и современных методик исследования (культурального, цитофлуориметрического, иммунохимического, микроскопического) на сертифицированном оборудовании. Используемые методы исследования обоснованы, подробно описаны и адекватны поставленным задачам.

Научная интерпретация полученных данных, базирующаяся на указанных методах исследования, обуславливает высокую степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных автором в диссертации. Научные положения и рекомендации логично вытекают из выводов, соответствуют цели, задачам и содержанию диссертации.

Достоверность и репрезентативность данных, полученных при проведении экспериментов сомнения не вызывает, так как они статистически грамотно обработаны и все материалы исследований, изложенные в диссертации, убедительно иллюстрированы поясняющими и подтверждающими изложенную информацию рисунками. Выводы,

научные положения и практические предложения аргументированы и конкретны, соответствуют диссертационным критериям, установленным в Положении.

**Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов**

Полученные автором результаты имеют большое значение как для биотехнологии (флуоресцентные наночастицы кремния как зонды), так и для медицины (НЧ Si/B, SiO<sub>2</sub>, Si/Au перспективны для исследований в области терапии онкологических заболеваний). Представленные результаты вносят значительный вклад в представление об эффектах взаимодействия наночастиц на основе кремния с иммунокомпетентными и стромальными клетками человека.

Апробированная в работе экспериментальная клеточная модель позволяет провести скрининг основных параметров жизнедеятельности на клеточном и субклеточном уровне при воздействии на клетки таких объектов, как наночастицы.

В результате проведенной работы апробирован метод оценки цитотоксичности НЧ *in vitro*, который может быть использован в отношении различных наноматериалов, как сферических частиц (наночастиц), так и наноматериалов других форм (спирали, стержни) в разных концентрациях. Показана возможность детектировать *in vitro* изменения под воздействием НЧ таких клеточных параметров, как жизнеспособность, изменения митохондриального и лизосомального компартментов, продукцию активных форм кислорода, скорость пролиферации.

Благодаря проведенным исследованиям, подтверждена высокая степень биосовместимости НЧ чистого кристаллического кремния. Выявлено, что модификация таких НЧ благородными металлами способна изменять характер их взаимодействия с клетками разных типов.

**Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов работы**

Полученные автором результаты исследования могут быть использованы в биотехнологии и биомедицине. Апробированная клеточная модель оценки цитотоксических свойств и исследованные параметры клеточного гомеостаза дают возможность лучше оценить биологические свойства нанообъектов. Также полученные данные могут быть использованы при планировании синтеза НЧ с заданными свойствами.

Результаты, описывающие возможные биологические эффекты наночастиц, используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре анатомии и физиологии сельскохозяйственных животных Рязанского агротехнологического университета.

Апробированную модель скрининга цитотоксических свойств нанообъектов следует рассмотреть на предмет возможной оценки других биологических параметров живой клетки, которые не рассматриваются в исследовании автора.

Структура диссертации традиционная: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение. Работа написана в доступном для восприятия стиле, содержит микрофотографии хорошего качества, иллюстрирована грамотно оформленными графиками, схемами и таблицами.

Выводы диссертации соответствуют полученным результатам и задачам исследования. Автореферат полностью отражает основные положения диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также 1 в зарубежном журнале, включенном в базу WoS.

Принципиальных замечаний по данной работе не имеется.

### **Заключение.**

Диссертационная работа Шубенкова Александра Николаевича «Эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека», выполненная под руководством д.м.н. член корр. РАН Буравковой Л.Б. является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача – изучение цитотоксических эффектов наноматериалов. Результаты исследования имеют большое значение для клеточной биологии, гистологии, фармакологии, токсикологии и нанотехнологии.

По актуальности, новизне и объему выполненных работ, научной и практической значимости полученных результатов работа Шубенкова А.Н. соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология», а её автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Отзыв обсужден и утвержден на заседании межлабораторной конференции Федерального государственного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики (ИТЭБ РАН), протокол №6 от 29.10.2015 г.

зав. лабораторией клеточно-тканевых  
механизмов компенсации функций  
биообъектов Федерального государственного

учреждения науки Института теоретической  
и экспериментальной биофизики  
Российской академии наук ИТЭБ РАН  
д.б.н. 03.03.01 – физиология

Куликов А.В.

ведущий научный сотрудник лаборатории  
клеточно-тканевых механизмов компенсации  
функций биообъектов Федерального  
государственного учреждения науки  
Института теоретической и экспериментальной  
биофизики Российской академии наук ИТЭБ РАН  
к.б.н. 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Павлик Л.Л.

(ИТЭБ РАН)

142290 Пушкино Московской области,

Ул. Институтская, 3

Тел. (495) 632-78-69 Факс (4967) 33-05-53

E-mail: office@iteb.ru



Подпись: *Куликов А.В.*  
*Павлик Л.Л.*  
УДОСТОВЕРЯЮ – ЗАВ. КАБ. Е. П. ГРУЗДЕВА