

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Шубенкова Александра Николаевича «Эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы выполненной работы

Диссертация Шубенкова А.Н. посвящена актуальной проблеме - изучению биологических эффектов различных типов кремниевых наночастиц на мезенхимальные стромальные клетки (МСК), а также клетки иммунной системы и фибробласты кожи. Данная проблема имеет важное значение для медицины, а предпринятый в работе анализ реакций, запускающихся в МСК в ответ на взаимодействие с частицами на основе кремния, представляет немалый интерес для клеточной биологии. Механизмы положительного действия МСК в различных клинических ситуациях несмотря на активное изучение во всем мире остаются изученными не полностью, особенно это касается практических эффектов, прежде всего иммуномодуляторных и противовоспалительных, что диктует необходимость глубоких экспериментальных исследований. С другой стороны, развитие нанотехнологий в последнее время позволяет получать различные материалы с направленным воздействием на физиологическое состояние клеток, в том числе, применяемых в клеточных технологиях. Отдельная проблема, затронутая в диссертационной работе, касается токсического воздействия наночастиц на различные типы клеток и также представляет немалый интерес как для медицинских специалистов, так и для фундаментальных исследователей. Таким образом, поставленная автором цель работы - изучить влияние модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека, является, несомненно, актуальной.

Автор поставил перед собой задачу анализа биологических эффектов различных наночастиц на наиболее распространенных и значимых для

биологии и практической медицины типов клеток, в том числе для создания адекватных тест-систем оценки токсичности этих материалов, включая выяснение эффектов на внутриклеточные органеллы и молекулярные процессы.

Научная новизна работы

В представленной работе впервые на культурах мезенхимальных стромальных клеток, мононуклеаров периферической крови и фибробластах кожи человека проведен сравнительный анализ цитотоксического действия наночастиц на основе кремния, таких как Si, Si/B, Si/Pd, Si/Au, Si/Ag и SiO₂. Выявлено, что большинство исследованных наночастиц не оказывают выраженного влияния на жизнеспособность данных типов клеток, практически не индуцируя апоптоз или другие типы клеточной гибели. Автором сделан вывод о том, что наибольшей биологической совместимостью обладают немодифицированные наночастицы кремния.

Одним из важных результатов являются показанные автором функциональные изменения митохондриального аппарата и лизосом иммунокомпетентных и стромальных клеток при воздействии на них 24-часовой экспозиции к наночастицам кремния, модифицированных благородными металлами. Показано, что некоторые частицы вызвали значимое снижение флуоресценции специфического митохондриального зонда, что указывает на уменьшение мембранного потенциала митохондрий, наибольшим эффектом в этом плане обладал Si/Pd.

Особый интерес представляет впервые показанная способность модифицированных благородными металлами наночастиц кремния активировать иммунокомпетентные клетки. В частности, автором было показано, что продукция активных форм кислорода в мононуклеарных клетках повышается при воздействии на них наночастиц кремния, при этом разные типы частиц приводили к различной активации генерации АФК: максимальный эффект наблюдался для наночастиц Si/B, минимальный – для SiO₂.

Наконец, чрезвычайно интересными представляются впервые показанные свойства наночастиц Si и Si/B увеличивать жесткость кортикального цитоскелета МСК с параллельным снижением содержания в них F-актина.

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

Примененные автором клеточно-биологические и цитологические методы адекватны поставленным задачам. Работа выполнена на большом объеме экспериментального материала с использованием как классических методов клеточной биологии, цитологии, иммунологии, так и современных методов лазерной конфокальной и атомно-силовой микроскопии.

Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Все это позволяет сделать заключение о высокой репрезентативности результатов и выводов диссертации. Представленные в автореферате и публикациях Шубенкова А.Н. результаты полностью отражают проведенные исследования.

Значимость для науки и практической медицины полученных автором результатов

Результаты диссертационного исследования по воздействию наночастиц на основе кремния на различные типы клеток человека вносят существенный вклад в понимание взаимодействия материалов нанометрового диапазона размеров с биологическими системами и являются фундаментальными.

Полученные в работе данные о морфо-функциональных изменениях в мезенхимальных стромальных и иммунокомпетентных клетках человека при воздействии наночастиц кремния и его производных позволяют предположить их биологические эффекты на организм человека, а также открывают возможности создания универсальных скрининговых тест-систем для анализа цитотоксичности и иных биологических эффектов подобных наноматериалов.

Выявленное в эксперименте влияние ряда кремниевых наночастиц на функционирование митохондрий клеток, генерацию ими активных форм кислорода, а также на активность лизосомального аппарата, следует учитывать как при планировании клинического применения наноматериалов на основе данных соединений, так и для исследовательской работы на таких типах клеток как МСК или мононуклеары крови.

Данные по анализу биосовместимости наночастиц кремния указывают на ее зависимость от характера модификации кремния и типа клеток, на которые воздействуют наночастицы, что необходимо учитывать при работе с подобными частицами как в лабораторных экспериментах, так и в клинике или на различных производствах, где возможно воздействие таких частиц на человека.

Проведенные исследования доказывают высокую биосовместимость наночастиц чистого кремния, возможность изменения его свойств при помощи модификаций и необходимость тестирования цитотоксичности. Особое внимание следует обращать на способность наночастиц активировать иммунные клетки.

Диссертация построена по традиционному плану. Полученные автором результаты грамотно, последовательно изложены. Работа иллюстрирована 33 рисунками и микрофотографиями хорошего качества, содержит 6 таблиц. Список цитируемой литературы включает 237 источников, в том числе 41 на русском и 196 - на иностранном языке.

В автореферате и опубликованных работах отражены основные положения диссертации. По материалам работы опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Одна из работ опубликована в зарубежном журнале, включенном в базу WoS. Отдельные аспекты работы изложены и обсуждены на 4 российских и международных конференциях.

Выводы основаны на большом фактическом материале и логично вытекают из результатов, полученных лично автором.

При знакомстве с представленным экспериментальным материалом возникают небольшие вопросы и замечания, требующие дополнительных комментариев и разъяснений диссертанта:

1. При анализе флуоресценции различных зондов в мононуклеарах (рис. 6 диссертации) базовое распределение интенсивности флуоресценции зонда часто отличается в разных образцах, что очевидно не является результатом воздействия наночастиц, а отражает вариабельность образцов клеток. Автором эти различия никак не комментируются, хотя очевидно, что они могут влиять и на интерпретацию эффекта наночастиц.
2. Следует быть более осторожным в интерпретации данных о флуоресценции зонда Lysotracker, которую автор трактует как отражающую активность лизосом. Этот зонд позиционируется как специфически накапливающийся в органеллах с кислым рН, но его использование для количественной оценки числа лизосом или их активности может быть недостаточно корректным, о чем предупреждает и его производитель.
3. На многих графиках не подписаны оси ординат, что затрудняет восприятие материала.

Следует отметить, однако, что эти вопросы не носят принципиального характера и не снижают общего хорошего впечатления от работы.

Заключение

Диссертация А.Н.Шубенкова является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная научная задача - эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека.

Результаты диссертационного исследования имеют большое теоретическое и практическое значение для клеточной биологии, цитологии, молекулярной и клеточной медицины.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертация Шубенкова Александра Николаевича «Эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека», соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории структуры и функции митохондрий
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»,
доктор биологических наук по специальности
03.03.04 - клеточная биология,
цитология, гистология



Плотников Егор Юрьевич

25 ноября 2015 г.

Индекс, почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр.40, к.430
телефон: (495) 9395944
E-mail: plotnikov@genebee.msu.ru

Отсюда
Клад-о/к
Доверяю:
Плотникова (Г.М. Плотникова)

