

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

В связи с активным развитием нанотехнологии и возрастающего объема и ассортимента используемых в разных областях деятельности человека наноматериалов остро встает вопрос создания адекватной и целостной системы оценки безопасности наночастиц. Характер воздействия наночастиц на метаболизм и жизнеспособность клеток остаются плохо изученным. Разнообразие материалов, из которых изготавливаются наночастицы, а также их модификация ставит проблему разработки надежных тестов для определения их цитотоксичности, биосовместимости и взаимодействия с разными типами клеток. Наблюдается отсутствие понимания механизмов, по которым наночастицы взаимодействуют с клетками и проявляют свои свойства. В связи с этим, диссертационная работа Шубенкова А.Н. посвящена актуальной проблеме и восполняет ряд пробелов, до сих пор существующих в данной области. Наиболее востребованной системой тестирования свойств широкого спектра веществ является культура клеток. В ряде работ *in vitro* продемонстрированы цитотоксические свойства наночастиц, однако чаще всего результаты были получены на стандартных панелях постоянных клеточных линий. Актуальность диссертационного исследования Шубенкова А.Н. определяется также выбором экспериментальных моделей, прежде всего иммунокомпетентных и мезенхимальных стромальных клеток.

Автор поставил перед собой целью изучить цитотоксические эффекты наночастиц кремния и их модификаций на функциональное состояние и жизнеспособность перечисленных клеточных типов для выяснения механизмов реализации эффектов наночастиц на клетки и организм в целом и создания адекватных моделей их предсказания и оценки.

Научная новизна работы

С помощью хорошо обоснованных и продуманных экспериментальных подходов впервые проведен сравнительный анализ цитотоксического действия наночастиц на основе кремния и их модификаций. Показано, что в культуре мезенхимальных стромальных клеток и мононуклеаров человека эти наночастицы оказывают очень слабое влияние на жизнеспособность клеток, но наиболее биосовместимы немодифицированные наночастицы кремния.

Автором впервые установлены функциональные изменения органелл, в частности, митохондрий и лизосом, после инкубации с наночастицами. Убедительно продемонстрировано, что кремниевые наночастицы, модифицированные благородными металлами, модулируют активность этих компартментов. Например, наночастицы Si/B увеличивают активность лизосомального компартмента стромальных клеток и снижают трансмембранный потенциал митохондрий.

Впервые продемонстрирована способность наночастиц активировать иммунокомпетентные клетки человека. Это результат привлекает внимание и заслуживает дальнейшего изучения.

Оригинальным и заслуживающим внимания результатом является выявленное автором влияние ряда наночастиц на кортикальный цитоскелет стромальных клеток и структуру F-актина.

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

Все научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации Шубенкова А.Н., хорошо обоснованы и логично вытекают из проделанных автором исследований. В работе приведен исчерпывающий литературный обзор на рассматриваемую тему, в котором использовано 224 литературных источника. Экспериментальная часть выполнена с привлечением современных методов клеточной биологии: культура клеток, проточная цитометрия, иммунофлуоресценция, использование разнообразных зондов, флуоресцентная и атомно-силовая микроскопия. Выбранные методы и протоколы исследований адекватны поставленным задачам. Объем выполненных экспериментов и их статистическая обработка позволяют сделать вывод о высокой достоверности результатов диссертации. Выводы основаны на большом фактическом материале и логично вытекают из результатов, полученных лично автором.

Значимость для науки и практической медицины полученных автором результатов

Полученные в диссертационной работе А.Н. Шубенкова результаты по воздействию наночастиц кремния на стромальные и иммунокомпетентные клетки человека существенно дополняют современные знания о характере взаимодействия наноматериалов с биологическими объектами. Фундаментальное значение имеют данные о воздействии наночастиц на органеллы клеток и содержание активных форм кислорода, а также активацию иммунокомпетентных клеток, как компонентов интегрирующей системы организма.

Примененный комплексный подход в исследовании воздействия наночастиц на клетки закладывает основу для создания единой системы тестирования наноматериалов. Результаты экспериментов по определению

содержания активных форм кислорода, воздействия на цитоскелет и органеллы клеток указывают на возможные пути и механизмы действия наночастиц на клетки и ткани человека.

Обнаруженное воздействие наночастиц, модифицированных благородными металлами, на функциональный статус клеток указывает на необходимость тщательного тестирования наноматериалов, применяемых в экспериментальных или клинических исследованиях. Полученные диссертантом результаты указывают также на специфичность действия наночастиц в зависимости от тканевой принадлежности клеток

Диссертация построена по традиционному плану, написана хорошим грамотным языком. Работа проиллюстрирована 33 рисунками и микрофотографиями, содержит 6 таблиц.

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

При знакомстве с диссертацией возникают некоторые вопросы и замечания, требующие дополнительных комментариев и разъяснений диссертанта:

1. Не очень понятно, чем обусловлен выбор фетальных фибробластов в качестве одного из типов клеток. Эти клетки имеют ряд свойств, отличающих их от клеток взрослого организма. В некоторых разделах, кроме того, они обозначены как «эмбриональные», что является некорректным.

2. В нескольких подразделах раздела «Материалы и методы» имеется отсылка на подраздел 2.5.1., который отсутствует. Видимо, имелся в виду подраздел 2.4.1.
3. В качестве метода оценки пролиферативной активности фибробластов был использован подсчет по фотографиям. Однако следует учитывать, что на количество клеток на единицу площади могут оказывать влияние такие факторы, как размер клеток, их подвижность, состояние межклеточных контактов. При построении кривых роста корректнее пользоваться подсчетами, произведенными с помощью счетчиков клеток.

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

Заключение

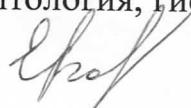
Диссертация А.Н.Шубенкова является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена актуальная научная задача – исследованы эффекты модифицированных наночастиц кремния на культивируемые иммунокомпетентные и мезенхимальные стромальные клетки человека.

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

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 проблем клеточной пролиферации
ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
д.б.н. 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология
Воротеляк Екатерина Андреевна



Индекс, почтовый адрес: 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26,
эл. почта vorotelyak@yandex.ru телефон (499)- 135-40-81

25 ноября 2015 г.

Подпись Е.А. Воротеляк заверяю:

Ученый секретарь
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН,
кандидат биологических наук



М.Ю. Хабарова