

О Т З Ы В

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Бгатовой Наталии Петровны на диссертационную работу Шарафутдиновой Люции Ахтямовны «Морфофункциональные изменения нервной, иммунной и репродуктивной систем при воздействии наноразмерного диоксида титана в форме рутила (экспериментальное исследование)», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы выполненной работы

Актуальность темы исследования определяется тем, что современные достижения нанотехнологий не всегда сопровождаются адекватными исследованиями воздействия наночастиц на живые организмы и экосистемы. В последние десятилетия наиболее широко в промышленных и потребительских товарах используются наночастицы диоксида титана, в связи с их высокой каталитической активностью.

Способность наночастиц диоксида титана придавать белизну и непрозрачность различным продуктам используется в красках, пластмассах, лекарствах и косметике. Кроме того они применяются в пищевой промышленности в качестве добавки, в солнцезащитных кремах, при обработке воды, загрязненной опасными промышленными побочными продуктами.

В связи с широким спектром использования, исследования воздействий наночастиц диоксида титана на здоровье человека и окружающую среду являются чрезвычайно актуальными. В настоящее время существует большое количество публикаций, в которых изучается токсическое действие наночастиц диоксида титана, но результаты часто противоречивы, вследствие большого разнообразия коммерческих форм наноразмерного диоксида титана с различными физико-химическими характеристиками или различными кристаллическими формами, главным образом рутила и анатаза. В связи с тем, что на сегодняшний день в литературе существует противоречивая информация

относительно негативных эффектов наночастиц диоксида титана, целью своего исследования Шарафутдинова Л.А. поставила - охарактеризовать морфофункциональное состояние нервной, иммунной и репродуктивной систем при воздействии рутильной формы нанодисперсного диоксида титана в экспериментальных условиях.

Новизна исследований и полученных результатов, выводов, рекомендаций, сформулированных в диссертации

Шарафутдиновой Л.А. впервые на экспериментальной модели показано, что нанодисперсная форма диоксида титана рутильной модификации в концентрации эквивалентной среднесуточной дозе потребления человеком оказывает на организм токсические эффекты. Впервые детально охарактеризованы деструктивные и компенсаторные изменения, развивающиеся в органах нервной, иммунной, пищеварительной и репродуктивной систем, связанные с токсическим воздействием нанодисперсной формы диоксида титана рутильной модификации.

Методами световой микроскопии и иммуногистохимического анализа впервые выявлено, что при пероральном введении наночастиц диоксида титана в тимусе и селезенке происходит снижение пролиферативной активности и апоптоз лимфоцитов, а в лимфатических узлах развивается гиперплазия В- и Т-зон и возрастание численной плотности макрофагов в лимфатических синусах.

Методами световой, электронной микроскопии и биохимии впервые показаны структурно-функциональные изменения в центральном органе метаболизма и детоксикации - печени, при пероральном введении наночастиц диоксида титана рутильной модификации в концентрации эквивалентной среднесуточной дозе потребления человеком. Автором выявлено развитие дистрофических изменений гепатоцитов и повышение активности АсАТ и АлАТ в крови, при этом увеличивалось количество CD68+ макрофагов и возрастала пролиферативная активность клеток.

Впервые методом атомно-силовой микроскопии *in vitro* выявлено изменение механических свойств поверхности нейтрофилов при их инкубации с наночастицами диоксида титана.

Впервые выявлена значительная активация глиальных клеток мозга, процессов ангиогенеза, дегенеративные изменения нейронов, изменения биоэлектрической активности нейронов фронтальной и теменной областей коры головного мозга крыс, а также повышение тревожности и уровня ориентировочно-исследовательской активности животных при интраназальном введении наноразмерного диоксида титана.

Впервые проведен детальный анализ деструктивных изменений в сперматогенном эпителии, свидетельствующий о нарушении процессов сперматогенеза при пероральном введении НЧ TiO₂. Выявлены увеличение показателей предимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности, а также признаки снижения скорости роста и морфо-функционального развития потомства в период раннего постнатального онтогенеза при пероральном введении НЧ TiO₂ самкам крыс.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность представленных в диссертационной работе научных положений и выводов основывается, прежде всего, на корректно поставленных задачах, применении адекватных современных методов исследования и статистической обработки данных. Диссертант грамотно использовал молекулярные маркеры и ультраструктурный анализ, позволяющие оценить механизмы развивающихся процессов на субклеточном, клеточном и органном и организменном уровнях организации изучаемых систем при воздействии наночастиц диоксида титана. Полученные данные проиллюстрированы микрофотографиями высокого качества, графиками, таблицами, детально и грамотно обсуждены с привлечением современных литературных данных.

Обоснованность научных положений, заключений основывается на согласованности данных эксперимента и научных выводов.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. В своей работе Шарафутдинова Л.А. использовала современный методологический подход к планированию и выполнению исследований. Исследование проведено на достаточном количестве экспериментальных животных. Материалы проведенного исследования широко апробированы на научных конференциях и конгрессах международного уровня. По теме диссертационной работы опубликовано 40 работ, 14 - в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Научная значимость диссертационной работы заключается в получении новых знаний о токсических эффектах наночастиц диоксида титана в форме рутила в концентрации эквивалентной среднесуточной дозе потребления человеком на жизненно важные органы и организм в целом. Проведенные автором обобщения и анализ экспериментального исследования расширяют существующие представления о механизмах токсического действия наноразмерной формы диоксида титана рутильной модификации на органы нервной, иммунной, пищеварительной и репродуктивной систем.

Полученные автором результаты свидетельствуют, что даже максимально допустимое содержание наночастиц диоксида титана в окружающей среде или продуктах питания не являются безопасными для организма и необходимы дополнительные исследования безопасных уровней содержания диоксида титана в продовольственных товарах, лекарственных препаратах, промышленных товарах и окружающей среде. Полученные результаты могут быть внедрены в обучающие курсы биологических и медицинских факультетов по гистологии, клеточной биологии, нанотоксикологии и опубликованы в виде монографии.

Оценка содержания работы

Диссертационная работа изложена на 256 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, 5 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, указателя литературы, включающего 100 отечественных и 472 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 68 рисунками.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, новизну, теоретическую и практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту. В первой главе автором представлен грамотный обзор литературы, свидетельствующий о хорошем знании диссертантом изучаемой проблемы.

В главе материалы и методы исследования представлена характеристика экспериментального материала и методов исследования. Из данной главы следует, что исследования проведены на крысах линии Вистар обоего пола. В работе использован нанодисперсный диоксид титана рутильной модификации. Средний размер наночастиц диоксида титана (НЧ TiO_2) составлял 40-60 нм. Концентрация НЧ TiO_2 была выбрана на основании анализа его потребления в составе различных продуктов питания.

Использованы разные способы введения НЧ TiO_2 - пероральное, интраназальное и прямое воздействие на нейтрофилы *in vitro*. Применены различные методы исследования: гистологический (3 способа окрашивания гистологических препаратов); трансмиссионная микроскопия; иммуногистохимический анализ (определены 7 маркеров); клинко-лабораторный анализ (18 параметров крови); атомно-силовая микроскопия (исследование нейтрофилов периферической крови); исследование биоэлектрической активности мозга (ЭЭГ); поведенческие тесты; исследование эмбриотоксического и тератогенного действия НЧ TiO_2 ; морфометрические методы; статистический анализ. Объектами морфологического исследования

были: органы иммунной защиты, печень, семенники, гиппокамп, центральное ядро миндалевидного комплекса головного мозга, нейтрофилы крови.

Результаты исследования отражены в 5 главах собственных исследований и их обсуждения. В главе 3.1 результатов исследования представлены данные изучения структуры лимфоидных органов крыс в условиях перорального введения наночастиц диоксида титана. Автором детально описано строение тимуса в контроле и опыте. Показано, что при введении НЧ диоксида титана в тимусе уменьшается доля коркового вещества, плотность клеточной популяции тимоцитов, число Ki-67-позитивных клеток в корковом веществе. При этом происходит увеличение p53+- клеток в корковом веществе дольки тимуса, возрастание клеток с признаками деструкции и увеличение количества макрофагов. Сходные изменения отмечены и в структуре селезенки. В структуре поверхностных шейных лимфатических узлов выявлено увеличение числа Ki-67+клеток и макрофагов, расширение краевых и мозговых синусов. Данные проиллюстрированы микрофотографиями высокого качества.

В главе 3.2. исследованы свойства нейтрофилов после воздействия наночастиц диоксида титана в условиях *in vitro* по данным атомно-силовой микроскопии и представлены клиничко-лабораторные показатели крови крыс на фоне перорального введения наночастиц диоксида титана. Показано изменение механических свойств поверхности нейтрофилов, возрастание количества гранулоцитов и снижение числа лимфоцитов.

В главе 3.3 представлены морфологические особенности печени при введении наночастиц диоксида титана. Показано развитие дистрофических изменений в гепатоцитах, активация клеток Ито и макрофагов (увеличение CD68+ макрофагов), наличие эндотелиоцитов с признаками апоптоза; возрастание пролиферативной активности с повышением числа Ki-67-иммунопозитивных клеток и повышение уровней АсАТ и АлАТ в крови.

В главе 3.4. отражены морфофункциональные изменения в различных структурах головного мозга при интраназальном введении наночастиц диоксида титана. Показано развитие деструктивных изменений в цитоплазме

нейронов различной локализации. При этом показатели электроэнцефалографии головного мозга крыс свидетельствовали о возможном развитии нейродегенеративных изменений в изучаемой области коры, характерных для неврозоподобного синдрома. Использование поведенческих тестов выявило, что интраназальное введение НЧ TiO₂ вызывало повышение степени тревожности крыс.

В главе 3.5 представлены результаты изучения репродуктивной системы крыс в условиях перорального введения наночастиц диоксида титана. Показано негативное действие НЧ TiO₂ на морфологические параметры семенников крысы - нарушение процессов сперматогенеза. Выявлено, что пероральное введение НЧ TiO₂ беременным самкам крыс оказывало эмбриотоксическое действие, которое выражалось в достоверном увеличении показателей эмбриотоксического эффекта -предимплантационной, постимплантационной и общей эмбриональной смертности. При изучении антенатального воздействия НЧ TiO₂ на постнатальное развитие потомства было выявлено повышение смертности крысят в период их вскармливания, отставание в наборе веса и задержка морфофункционального созревания на постнатальном этапе онтогенеза.

Обсуждение полученных результатов проведено на хорошем уровне с привлечением современных литературных источников. Выводы отражают суть диссертационной работы и логично вытекают из полученных автором фактических данных и соответствуют поставленным целям и задачам.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации, все основные положения и выводы. Работа соответствует паспорту специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология пунктам 5, 6. Принципиальных замечаний по научному содержанию и оформлению работы не имеется. В качестве дискуссии хотелось бы получить от автора ответы на следующие вопросы:

1. Наблюдали ли накопление агрегатов диоксида титана в цитоплазме гепатоцитов, клеток Купфера или макрофагов других исследованных органов?

Каков механизм поглощения и где в цитоплазме клеток могут накапливаться наночастицы диоксида титана, оказывая в последующем кумулятивный эффект?

2. В работе показано снижение содержания в гепатоцитах цистерн гладкой эндоплазматической сети. С чем это может быть связано и разрушается ли диоксид титана в печени? В какой зоне печеночной дольки обнаружена пролиферация клеток и развиваются компенсаторные процессы?

3. Сопровождались ли деструктивные или компенсаторные изменения в клетках изученных органов с развитием аутофагии?

Обобщая все вышесказанное, следует подчеркнуть, что диссертация Шарафутдиновой Л.А. представляет собой комплексный и завершённый труд, выдержанный в хорошем литературном стиле, хорошо иллюстрированный, который по методическому уровню и полученным результатам отвечает самым высоким требованиям. Особенностью диссертационной работы является использование классического морфологического подхода к исследованию структуры органов и применение современных, адекватных поставленным задачам методов трансмиссионной, атомно-силовой микроскопии, иммуногистохимического анализа, что дало возможность получения результатов на субклеточном, клеточном, органном и организменном уровнях организации, которые позволили расширить представления о токсических эффектах наноразмерного диоксида титана в форме рутина.

Заключение

Таким образом, по актуальности, методическому уровню, теоретической и практической значимости диссертационная работа Шарафутдиновой Люции Ахтямовны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема – исследовано морфофункциональное состояние органов нервной, иммунной и репродуктивной систем при воздействии рутильной формы нанодисперсного диоксида титана в экспериментальных условиях, имеющая существенное значение для клеточной биологии, цитологии, гистологии и нанотоксикологии.

