

О Т З Ы В

**официального оппонента на диссертационную работу
Шарафутдиновой Люции Ахтямовны «Морфофункциональные изменения нервной,
иммунной и репродуктивной систем при воздействии наноразмерного диоксида
титана в форме рутила», представленную на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология,
гистология**

Актуальность темы диссертационного исследования

Проблема исследования влияния наноматериалов на организм человека, в общем, и становление нанотоксикологии, в частности, в последние годы приобрела особую значимость. Во-первых, резко выросло число промышленных предприятий, выпускающих наноматериалы, и актуальной задачей является не только исследование воздействия наноматериалов на сотрудников таких предприятий, но и, в связи с неизбежным попаданием наноматериалов в окружающую среду, важно осознать, как они будут влиять на экосистемы и организм человека. Во-вторых, делаются многочисленные попытки внедрять наноматериалы в качестве систем адресной доставки и диагностики в клиническую практику. С этой точки зрения, прямое исследование токсических свойств наноматериалов, в том числе на уровне клеток и тканей, является чрезвычайно важным. В-третьих, наноматериалы по своим физико-химическим свойствам значительно отличаются как от твердых материалов, так и от отдельных химических элементов, составляющих эти материалы, поэтому невозможно данные, полученные в рамках традиционных токсикологических исследований по отдельным элементам экстраполировать на нанотоксикологию. Диоксид титана является одним из наиболее используемых наноматериалов, который применяется не только в медицинской, но и в пищевой промышленности, поэтому представленное диссертационное исследование, несомненно, является актуальным.

Объектом исследования являются морфофункциональные особенности клеток и тканей основных регуляторных систем организма (иммунной и нервной), а также репродуктивная система.

Предметом исследования являются изменения, вызываемые в этих системах под воздействием наноразмерного диоксида титана, а также изменение поведенческой модели и отдаленные последствия воздействия при анализе эмбрионального и раннего постнатального развития.

Новизна исследования

Опираясь на текст диссертации и автореферата, следует достаточно уверенно указать на вклад Шарафутдиновой Л.А. в исследования влияния наноразмерного диоксида титана на целый ряд жизненно-важных систем организма человека: кровеносную, иммунную, нервную, репродуктивную. На мой взгляд, центральная новизна представленного исследования заключается и в комплексности подхода, и в привязке выявленных дегенеративных изменений, выявленных на уровне отдельных клеток и тканей к нарушению поведенческих функций. Несомненный интерес вызывает и впервые выявленная макрофагальная реакция в синусах лимфатических узлов и в печени. Важными являются и впервые выявленные различия в реакции разных органов. Например, в селезенке наблюдалось опустошение корковой зоны на фоне снижения пролиферативной активности клеток и выраженной их гибели. Вместе с тем, в печени на фоне дистрофических изменений наблюдаются попытки развития компенсаторных реакций, выражающиеся в росте пролиферативной активности гепатоцитов, что выявляется диссертантом впервые. Под воздействием наноразмерного диоксида титана выявлена разнонаправленная реакция со стороны нервной системы: дегенеративные изменения нейронов, но активация глиальных клеток (астроцитов) и ангиогенеза. Впервые выявлено, что эти изменения коррелируют с изменениями биоэлектрической активности нейронов префронтальной области коры головного мозга и нарушениями поведенческих реакций крыс. Впервые выявлены дистрофические изменения в сперматогенном эпителии, свидетельствующие о нарушении процессов сперматогенеза, а также эмбриотоксическое действие наноразмерного диоксида титана. В заключении и выводах делается попытка сопоставления воздействия наноразмерного диоксида титана между разными системами органов.

Теоретическая и практическая значимость

Соискателем детально исследованы морфологические особенности тимуса, селезенки и поверхностных шейных лимфатических узлов. Антитела и система детекции для иммуногистохимического анализа выбраны корректно, представлены микрофотографии высокого качества, проведена статистическая обработка результатов. Исследованы показатели крови человека и крыс, а также морфологические особенности печени на фоне введения наночастиц диоксида титана. Соискателем впервые выявляется, что альтерация печени выявлена в меньшей степени, чем у других органов и систем органов, хотя и здесь наблюдается некоторое количество ультраструктурных «подпороговых» изменений. По всей вероятности, наименьшая степень альтерации

печени связана с ее высокой регенеративной активностью и компенсаторными способностями.

Наиболее интересными главами являются исследование влияния наночастиц диоксида титана на центральную нервную систему и выявление воздействия альтерации нейронов гиппокампа и миндалевидного комплекса мозга на показатели энцефалограммы и поведенческую модель крыс.

Не менее важной и интересной является глава, посвященная исследованию прямых (воздействие на семенники) и отдаленных последствий воздействия наночастиц диоксида титана (влияние на эмбриональное и постнатальное развитие потомства).

Таким образом, на базе большого экспериментального материала соискателем впервые показано разнонаправленное альтерирующее воздействие наноразмерного диоксида титана на разных уровнях организации живой материи – клеточном, тканевом, органном, организменном.

Поскольку диоксид титана уже сейчас довольно широко применяется в пищевой, косметической промышленности и медицине, результаты, полученные соискателем, представляют собой не только теоретическую, но и несомненную практическую значимость.

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

В диссертационной работе Шарафутдиновой Л.А. использовано большое количество современных методов и подходов, позволяющих сделать заключение об обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. В частности, для исследования морфологических аспектов воздействия наночастиц диоксида титана использованы гистологические методы исследования (включая, иммуногистохимию), типовые клинко-лабораторные исследования и высокоточная сертифицированная методика атомно-силовой микроскопии. Функциональная часть исследований базируется на электроэнцефалограмме и поведенческих тестах. Исследование эмбриотоксического и тератогенного действия диоксида титана было проведено согласно отраслевым стандартам. Используемая автором статистическая обработка корректна. Обращает на себя внимание, что автор не ограничивается только клеточным и тканевым уровнем исследований, но и рассматривает общеорганизменный эффект (поведенческие тесты) и даже отдаленные последствия воздействия наночастиц диоксида титана (эмбриотоксичность и тератогенность). Таким образом, объем проделанной работы, и набор используемых методов позволяет сделать заключение о комплексном характере

исследования. Есть одно замечание к положению 2, выносимому на защиту, которое будет приведено в соответствующем разделе.

Выводы сформулированы корректно и четко. Результаты исследования прошли широкую апробацию и внедрены учебный процесс на кафедре общей патологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Представленная диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, четырех глав, заключения и выводов. Общий объем диссертации составляет 257 страниц, включая 69 рисунков хорошего качества и 14 таблиц. Список цитируемой литературы включает 584 наименования. В главе 1 «Обзор литературы» приводится общая характеристика наночастиц и рассматриваются их токсические свойства. В главе 2 «Материалы и методы исследований» соискатель описывает общий объем проведенного исследования, его этическое обоснование, основной дизайн, серии и используемые методы. В главе 3 «Результаты собственных исследований» последовательно описываются результаты (с приведением соответствующей доказательной базы в виде иллюстраций и таблиц, с данными, подвергнутыми статистической обработке) по влиянию наночастиц диоксида титана на лимфоидные органы крысы, показатели крови человека и крысы, печени, центральной нервной системы, репродуктивной системы крысы. В главе 4 «Обсуждение полученных результатов» суммируются и обсуждаются полученные результаты в сопоставлении с другими авторами, проводившими сходные исследования. Эта глава заканчивается суммарной таблицей, где отражено воздействие наноразмерного диоксида титана на отдельные клетки, ткани и органы.

Выводы диссертации содержательны, обоснованы полученными данными.

По материалам диссертации опубликовано 40 научных работ, из них 14 статей в журналах, включенных ВАК России в перечень изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационного исследования.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты работы Шарафутдиновой Л.А. уже внедрены в учебный процесс целого ряда ведущих отечественных ВУЗов и, несомненно, должны быть внедрены в лекционные курсы, читаемые для студентов медико-биологических специальностей, а также для студентов нанотехнологических специальностей. Кроме того, они могут быть напрямую включены в протоколы нанотоксикологических исследований, вследствие своей информативности.

Замечания

С сожалением нужно отметить довольно небрежное оформление текста диссертации, в котором есть грамматические, пунктуационные, логические ошибки и опечатки. Некоторые утверждения в области иммунологии являются ошибочными.

Конкретные примеры.

1. Видовые и родовые названия бактерий, выражения *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* принято писать курсивом, а не как соискатель (стр. 10, 14, 26, 48 и т.д.). Формулы не принято вставлять в текст, они обязательно должны выводиться отдельно и желательно быть пронумерованы. Для облегчения восприятия лучше было бы использовать не подрисуночную подпись степени увеличения, а пользоваться барами. Во многих таблицах приводится разная степень точности величин, а общепринятым является тезис, что в каждой отдельной таблице количество цифр после запятой должно быть одинаковым. Многие из аббревиатур не включены в список сокращений (например, стр. 31, стр. 45, стр. 53, стр. 60, стр. 61, стр. 62, стр. 68, стр. 84);

2. Что означают фразы «На ранних стадиях развития опухоли ее клетки питаются кислородом» (стр. 25), «Включение ионов серебра на мочевого катетер» (стр. 26), «опсонизирующее удаление» (стр. 40), «мешать работе иммунных клеток посредством самых разных механизмов» (стр. 51), «важнейшим клеточным типом тимуса» (стр. 101), «гиперагрессия нейтрофилов» (стр. 124), «гормоны воспаления» (стр. 194)?

3. Абзац 2 на стр. 41 является абсолютно некорректным с точки зрения иммунологии, хотя возможно соискатель неверно перевел с английского. Аналогично на стр. 42 – образование специфических антител к наночастицам – этого в принципе нет и быть не может, это свидетельствует о безграмотности в области иммунологии. Аналогично на стр. 114 – наночастицы не могут быть антигенами, это вытекает из определения антигенов;

4. На стр. 75 при цитировании одной и той же работы речь идет то о мышах, то о крысах;

5. Рис. 3 присвоено и боковому профилю нейтрофила (стр. 96) и препарату тимуса (стр. 98).

Основное замечание относится к положению 2, выносимому на защиту. «Негативные эффекты НЧ TiO₂ на нейтрофилы периферической крови человека заключаются в значительном изменении морфологии клеток и повышении ригидности их поверхности, что косвенно указывает на потенциально низкую деформируемость в микроциркуляторном русле и, следовательно, на нарушение миграционной способности лейкоцитов». Вопрос – зачем нужно было брать нейтрофилы человека, если весь остальной комплекс исследований был выполнен на крысиной модели. Вызывает вопросы и корректность расчета модуля Юнга. В частности, исследуя токсическую активность наноматериалов (квантовых точек, ап-конверсионных наночастиц, наночастиц магнетита) на нейтрофильных гранулоцитах мы всегда сталкивались со статистически значимым снижением модуля Юнга, что было обусловлено гибелью клеток по механизму некроза. Значительное увеличение модуля Юнга наблюдали лишь на отдельных клетках, погибших по механизму мумификации. Чем автор может объяснить такое существенное расхождение результатов? В любом случае, нельзя делать заключения ни о деформируемости, ни тем более о нарушении миграционной активности лейкоцитов, которые автором даже не исследовались. Еще менее понятна экстраполяция результатов, полученных на нейтрофилах на все лейкоциты крови. Кроме того, есть вопросы к самому методическому комплексу по измерению модуля Юнга: (1) В табл. 3, п. 6 (стр. 88) приводится доза 0,75 мг/л, но не указано количество нейтрофилов при введении этой дозы; (2) Почему диоксид титана разводили в воде, а не в физиологическом растворе (стр. 87), не было ли в данном случае частью альтерирующего воздействия влияние гипоосмотической среды? (3) Почему брали 0,45% раствор NaCl (стр. 91), а не физиологический раствор 0,9%? Вновь, не было ли влияние гипоосмотичности определяющим? (3) Некорректно говорить об упругих свойствах поверхности, необходимо говорить об упругости или ригидности мембрано-цитоскелетного комплекса; (4) Какова была глубина наноиdentации кончика зонда, геометрия зонда и скорость его подвода, и всегда ли проводили измерения модуля Юнга в одних и тех же точках? С учетом полиморфизма нейтрофилов для определения ригидности это может иметь определяющее значение; (5) Как можно делать заключения об изменении степени шероховатости клеток, если, судя по рисункам, не проведен даже леверинг? Кроме того,

нейтрофилы – чрезвычайно полиморфная фракция клеток крови, у которых полиморфизм проявляется не только в морфологии, но даже в функционале.

Несмотря на замечания не вызывает ни малейшего сомнения самостоятельное выполнение соискателем всех серий исследований, самостоятельная обработка полученного материала, оригинальность представленной работы. Все это позволяет считать выводы и рекомендации соискателя, приведенные в диссертации и в автореферате достоверными.

Личное участие автора заключалось в планировании исследования, постановке цели и задач, выборе методов исследования и подборе адекватных маркеров, проведении экспериментов, заборе материала для исследования, анализе экспериментальных данных, статистической обработке, теоретическом обобщении результатов исследования, подготовке публикаций.

Высказанные выше вопросы и замечания не умаляют значение настоящего диссертационного исследования, которое является завершенной научно-квалификационной работой.

Заключение


Диссертационная работа Шарафутдиновой Люции Ахтямовны «Морфофункциональные изменения нервной, иммунной и репродуктивной систем при воздействии наноразмерного диоксида титана в форме рутила», выполненная при консультации д.б.н. Валиуллина Виктора Владимировича, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические и практические положения совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области изучения воздействия наночастиц диоксида титана на морфофункциональные изменения нервной, иммунной и репродуктивных систем.

Результаты диссертационного исследования имеют большое научно-практическое значение для клеточной биологии, цитологии и гистологии, патофизиологии, патологической анатомии.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа Шарафутдиновой Люции Ахтямовны соответствует требованиям пп.9 - 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями от 21 апреля 2016 г №335), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная

биология, цитология, гистология, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент

Профессор кафедры «Нанотехнология и биотехнология» Федерального государственного бюджетного Образовательного учреждения высшего образования «Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева», Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
доктор биологических наук, специальности
03.00.13 – физиология и
14.00.36 – аллергология и иммунология, доцент  Плескова Светлана Николаевна
тел: +7(906) 350-52-80
e-mail: pleskova@mail.ru,
адрес: 603950, Нижний Новгород, ул. Минина, 24

28.01.2020 г.

Подпись профессора Плесковой С.Н. удостоверяю
Ученый Секретарь Ученого совета НГТУ им. Р. Е. Алексеева  Мерзляков И.Н.

