

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, доцента, директора НИИ экологии и биотехнологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина», Гусева Александра Анатольевича на диссертационную работу Фахардо Анны Фабиовны «Регуляция жизнеспособности клеток млекопитающих в условиях воздействия наноструктур», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Актуальность темы исследования

Противоречивость имеющихся данных о токсичности наночастиц в условиях *in vitro* и *in vivo* накладывает ограничения на развитие биомедицинских нанотехнологий, имеющих значительный потенциал. Особенно можно выделить наночастицы оксидов металлов, а также ДНК-наноконструкции, перспективные для адресной доставки терапевтических агентов, магнитоуправляемой тераностики, радиосенсибилизации, генной терапии. Поэтому актуальность проведенного исследования не вызывает сомнений.

Новизна исследования

Научная новизна проведенной работы связана с тем, что впервые была проведена комплексная оценка цитотоксичности *in vitro* и острой токсичности *in vivo* широкого спектра металлоксидных наночастиц и ДНК-наноконструкций в рамках одного исследования. Это позволило диссертанту получить новые данные об эффектах воздействия исследованных наноструктур на млекопитающих на клеточном, органно-тканевом и организменном уровнях, что, несомненно, будет востребовано в биомедицине.

Научная и практическая значимость результатов исследования

С теоретической точки зрения, полученные результаты расширяют существующие представления о закономерностях и механизмах взаимодействия биологических структур и искусственных нанообъектов, при этом решающее значение, наряду с химической природой, имеют характеристики поверхности наночастиц, определяющие особенности нанобиоинтерфейса. Результаты работы, в целом, указывающие на биосовместимость исследованных наночастиц оксидов металлов и ДНК-

наноконструкций, а также касающиеся выявленных ограничений, связанных с их цитотоксичностью и острой токсичностью при пероральном введении, создают научные основы для дальнейшего использования указанных наноструктур при разработке средств адресной доставки лекарственных препаратов, магнитоуправляемых наномедицинских платформ, противоопухолевых радиосенсибилизаторов, систем генной терапии, что определяет практическую значимость исследования. Материалы диссертации также могут быть использованы при разработке лекционных курсов.

Оценка содержания диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 124 страницах, включает 31 рисунок и 10 таблиц. Список литературы включает 202 источника, в том числе 198 опубликованных в зарубежных журналах.

Во введении автор формулирует цель и задачи исследования, логично обосновывает выбор тематики, актуальность исследования, научную новизну и практическую значимость.

Первая глава представляет собой литературный обзор, в котором автором подробно проанализированы и систематизированы существующие научные данные о перспективах биомедицинского применения, биосовместимости и токсичности исследуемых наноструктур.

Вторая глава содержит описание использованных в исследовании материалов и методов, в целом, соответствующих современным общепринятым в нанотоксикологии практикам. Автором были комплексно изучены физико-химические свойства исследуемых материалов: размер и морфология наночастиц исследовались с помощью просвечивающей электронной микроскопии, кристаллическая фаза и кристалличность исследовались методом рентгеновской дифрактометрии. Получение гидрозолей наночастиц осуществлялось с помощью ультразвукового диспергирования, затем коллоиды исследовались методом динамического светорассеяния с оценкой дзета-потенциала. Подробно описаны биологические методы работы с клетками и животными (лабораторными мышами), включая методы культивирования клеток, трансфекции ДНК-цепей, проточной цитофлюорометрии, количественной ПЦР в реальном времени, определения апоптоза и окислительного стресса, облучения культур клеток, гистопатологической оценки, а также статистического анализа.

В третьей главе изложены основные результаты диссертации, полученные с помощью обработки экспериментальных данных. Построены

таблицы и гистограммы, отражающие изменения исследуемых показателей, представлены рисунки, иллюстрирующие результаты исследований наночастиц, а также биологических экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Представленные материалы позволяют говорить о высоком научно-методическом уровне работы и достоверности полученных результатов.

Четвертая глава содержит анализ полученных результатов с привлечением литературных данных. Автором указывается на отсутствие выявленных цитотоксических эффектов в экспериментах с культурами клеток, а также обсуждаются возможные механизмы токсического действия наночастиц ZrO_2 на лабораторных животных в остром эксперименте. Данная глава обеспечивает основные выводы диссертационного исследования.

В заключении суммируются положения, сформулированные в четвертой главе, и делаются обоснованные и соответствующие цели и задачам работы выводы по исследованию в целом.

Степень обоснованности, достоверности и новизны научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации

Работа выполнена с использованием современных методов молекулярной, клеточной биологии и токсикологии. Автором выбраны адекватные поставленным задачам методы статистической обработки. Можно сделать заключение о высокой степени обоснованности, достоверности и новизне научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Полнота изложения результатов диссертации в опубликованных работах

Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в 12 научных статьях, одной главе в монографии, а также в рамках полученного патента на изобретение, что позволяет говорить о достаточно полном их освещении для научной общественности.

Замечания и вопросы по диссертации

1. Цель работы должна отвечать на вопрос «зачем?», в противном случае получается логическая нестыковка – «Целью исследования являлись исследования...». С этой точки зрения формулировка цели могла бы содержать такие обороты, как «оценка ... показателей для выявления биохимических механизмов регуляции жизнеспособности клеток под действием наноструктур», «...для

формирования научных основ использования исследованных наноструктур в биомедицине» и т.п.

2. Почему при выборе объектов исследования остановились именно на данном перечне неорганических наночастиц (оксиды гафния, циркония, титана, железа, алюминия, тантала)? Например, наночастицы золота, серебра или оксид цинка не менее перспективны (и уже используются) в медицине и косметологии.
3. В ходе анализа литературных источников диссертантом несколько поверхностно делается вывод об отсутствии цитотоксичности наночастиц магнетита. При этом на с. 14 диссертации делается ссылка на работу Valdiglesias с соавт. (2015 г.), в которой, однако, формулировки более осторожны – «В целом, имеющиеся исследования не предоставляют достаточных доказательств для полной оценки потенциальных рисков для здоровья человека, связанных с воздействием наночастиц оксида железа. Требуются дополнительные исследования в этой области, включая изучение потенциальных долгосрочных эффектов». Это справедливо, поскольку существует много свидетельств цитотоксичности наночастиц на основе железа, что отмечается и диссертантом на с. 62 диссертации. При получении магнитоуправляемых наноконтейнеров для тераностики, ядра, представляющие собой магнитные наночастицы, покрывают золотыми оболочками, чтобы снизить возможные токсические проявления.
4. Исходя из чего исследовались неорганические наночастицы с различным гидродинамическими диаметрами в коллоидах (от 25 до 130 нм)? Возможно, целесообразно было бы с помощью дополнительной обработки (например, УЗ) привести частицы к единому размеру (например, 25 нм) для более точного сопоставления свойств. Интересные данные можно было бы получить также в ходе исследования эффектов наночастиц одной химической природы, но разных размеров.
5. Судя по данным, приведенным в табл. 2 диссертации, коллоидные системы, включавшие наночастицы TiO_2 и ZrO_2 , были агрегативно не устойчивыми (значения дзета-потенциала по модулю существенно меньше 20). Это могло повлиять на результаты исследований – возможно, на биообъекты воздействовали уже не сами частицы, а их агрегаты, обладающие иными свойствами.
6. Почему в качестве дополнительного контроля не использовались ионные формы или растворимые соединения гафния, циркония,

титана, железа, алюминия, тантала? Это позволило бы отделить специфические «нано» эффекты от эффектов, связанных с присутствием ионов металлов.

7. С чем, по мнению диссертанта, связана относительно высокая доля апоптозов и некрозов клеток HeLa в варианте с наночастиц TiO_2 ?
8. Возможно, стоило бы провести исследования сочетанной токсичности магнитных наночастиц и ДНК-конструкций, поскольку совместное использование этих наноструктур в рамках магнитотрансфекции вполне вероятно.
9. Численность каждой группы экспериментальных животных – по 4 особи – является спорной с точки зрения получения статистически-значимых результатов. Следовало бы увеличить численность особей в группе хотя бы до 7.
10. Диоксид циркония является химически и биологически инертным материалом, в связи с чем находит широкое применение, например, в стоматологии. Поэтому возникает вопрос – могут ли быть наблюдаемые патологические эффекты, вызываемые наночастицами ZrO_2 в высоких концентрациях, изначально связаны не с биохимическим, а с механическим действием наночастиц и их агрегатов на организм животных (механическое повреждение стенок кишечника, закупорка сосудов и т.п.)? Тем более что, судя по всему, анализ накопления наночастиц и составляющих их металлов в органах животных не проводился.
11. Имеет место не совсем точное использование терминологии. Например, применительно к TiO_2 , вместо термина «оксид титана», лучше использовать «диоксид титана» или «оксид титана IV». На с. 94 вместо фразы «выявленный эффект не был биологически значимым» правильнее было бы использовать «выявленный эффект не был статистически значимым».
12. В диссертационной работе присутствуют стилистические и грамматические ошибки, например, на с. 6 «ДНК-нанокострукций», на с. 12 «Оксид циркония широко используется в качестве имплантатов» (правильнее – «в составе»), на с. 34 «побочных эффектов».

Указанные замечания и недочеты, однако, не являются принципиальными и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы.

Заключение о соответствии диссертации и автореферата требованиям «Положения о присуждении ученых степеней»

Диссертация Фахардо Анны Фабиовны «Регуляция жизнеспособности клеток млекопитающих в условиях воздействия наноструктур» является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, имеющей высокую актуальность, научную новизну, теоретическую и практическую значимость.

Диссертационная работа А.Ф. Фахардо «Регуляция жизнеспособности клеток млекопитающих в условиях воздействия наноструктур» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в действующей редакции, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а А.Ф. Фахардо заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, доцент,
Директор НИИ экологии и биотехнологий
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Тамбовский государственный
университет имени
Г.Р. Державина»



Гусев Александр Анатольевич

10.12.2020 г.

Адрес: 392036, г. Тамбов, Интернациональная ул., 33

<http://tsutmb.ru/>

Тел.: +79107564546

nanosecurity@mail.ru

Подпись д.б.н., доцента Гусева А.А. удостоверяю:

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный
университет имени Г.Р. Державина»



Юрина Е.А.