

ОТЗЫВ

официального оппонента, профессора, заслуженного деятеля науки РФ, доктора биологических наук Артюхова Валерия Григорьевича на диссертацию Пшеничникова Станислава Евгеньевича «Применение наночастиц оксидов железа для индукции процессов регулируемой клеточной смерти», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Пшеничникова С.Е. посвящена исследованию использования наночастиц оксидов железа различных конфигураций для активации процессов клеточной гибели. В работе подробно исследованы, с использованием актуальных методов клеточной биологии и микроскопии, особенности взаимодействия наноматериалов в условиях *in vitro* с клеточными культурами человека. Показаны различия в характере индуцируемых клеточных процессов в зависимости от формы наночастиц.

Проведенный в диссертационной работе комплексный анализ взаимодействия наночастиц оксидов железа с серией клеточных культур человека (Jurkat, Alexander, HepG2, Huh7), дополняет существующие представления о характере клеточных процессов, связанных с внутриклеточной интернализацией наноматериалов, пермеабиллизацией мембран и сопутствующими цитотоксическими процессами. Важное теоретическое и практическое значение имеют продемонстрированные результаты об различиях в интенсивности пермеабиллизации лизосомальных мембран в зависимости от применения различных наноматериалов (нанокубов и нанокластеров). В работе экспериментальным путем обнаружено, что уровень экспрессии факторов, ингибирующих аутофагию (Bcl-2), имеет решающее значение в определении судьбы клеток, подвергшихся воздействию со стороны наночастиц. Также в диссертации продемонстрирована возможность усиления цитотоксического потенциала магнитных наночастиц посредством приложения постоянных магнитных полей умеренной напряженности.

Таким образом, проведенные в рамках диссертационной работы исследования расширяют и дополняют существующие знания о взаимодействии наночастиц оксидов железа с клеточными линиями человека в условиях *in vitro*. Полученные данные о клеточных процессах, связанных с цитотоксичностью наночастиц и их внутриклеточной интернализацией, формируют основы для разработки инструментов по направленной индукции процессов клеточной смерти в клетках-мишенях. Это может быть использовано для разработки методик направленной (избирательной)

элиминации опухолевых клеток в ходе противораковой терапии. Можно сделать вывод, что данная диссертационная работа актуальна и несёт теоретическое и практическое значение.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа изложена на 116 страницах машинописного текста, состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, объектов и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 201 наименование, в том числе 195 на иностранном языке. Текст диссертации включает 30 рисунков.

Работа построена логично и оформлена в соответствии с требованиями ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Во **введении** изложены данные об актуальности диссертационной работы, обозначены цель и задачи исследования, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также приведены сведения об апробации материалов исследования на различных научных конференциях и приведен список публикации по теме диссертационной работы. Отдельно обозначены научные положения, выносимые на защиту.

В **обзоре литературы (первая глава)** подробно представлены современные научные данные о наноматериалах и наночастицах оксидов железа, как перспективных материалов для бионанотехнологии и биомедицины. Описана современная классификация форм и типов клеточной смерти, а также взаимосвязь форм регулируемой клеточной смерти друг с другом. Отдельно описаны механизмы индукции процессов клеточной смерти с использованием наночастиц оксидов железа, а также рассмотрен потенциал их использования для нужд биомедицины.

Подробное изучение современной научной литературы и выявление актуальных областей исследования позволили обоснованно подойти к выбору объектов и методов исследования, представленных в главе **объекты и методы исследований (вторая глава)**. В качестве объектов исследования представлен ряд клеточных культур человека, а также три типа наночастиц, использованных в экспериментах. В данной главе в деталях описаны методы и протоколы, использованные в диссертационном исследовании.

Глава **результаты и обсуждение (третья глава)** включает две подглавы.

Первая подглава (3.1) посвящена полученным результатам в ходе исследований воздействия наночастиц магнетита на жизнеспособность клеток Т-лимфобластного лейкоза (Jurkat) и мононуклеарных клеток крови человека (МНК). Рассмотрен подход по усилению цитотоксического эффекта наночастиц магнетита при приложении постоянных магнитных полей.

Показано, что цитотоксические процессы наночастиц связаны с образованием активных форм кислорода (АФК) в экспериментальных клетках.

Вторая подглава (3.2) включает три раздела и посвящена подробному анализу влияния формы наночастиц на характер клеточного ответа.

В разделе 3.2.1 показаны результаты воздействия наночастиц оксидов железа: нанокубов и нанокластеров на клеточные линии Alexander, HepG2 и Huh7 – приведено подтверждение острой гепатотоксичности представленных наноматериалов. Показано, что воздействие нанокубов и нанокластеров сопровождается проявлением у экспериментальных клеток внешних признаков течения апоптоза – транслокации фосфатидилсерина, фрагментации клеточных ядер и нарушения целостности цитоплазматических мембран, циркуляризации, фрагментации и дисфункции митохондрий, дестабилизации лизосом и активацию каспазы-3.

В разделе 3.2.2 представлены результаты по активации наночастицами аутофагических процессов в клетках. Представлены результаты визуализации морфологии митохондрий экспериментальных клеток и процессы деполяризации митохондриальных мембран. Дана оценка процессу липидизации LC3, индуцированная воздействием нанокубов. Показаны микроскопические изображения аутофагосом, сформировавшиеся после воздействия наночастиц. Показано, что нанокубы индуцируют аутофагический тип клеточной смерти в клеточных линиях Alexander и Huh7. При этом нанокластеры, наоборот в данных клеточных линиях индуцируют апоптоз. Обнаружено, что благодаря высокому уровню экспрессии Bcl-2 (по сравнению клеточными линиями Alexander и Huh7) в клетках HepG2 индуцируется апоптоз, а не аутофагия.

В разделе 3.2.3 представлены результаты, описывающие прогрессивную пермеабиллизацию лизосомальных мембран в экспериментальных клетках после воздействия нанокубов и нанокластеров. Показаны итоги анализа морфологии лизосом после воздействия наночастиц и внутриклеточной локализации интернализированных наночастиц. Обнаружено, что локализация наночастиц в лизосомах приводит к дестабилизации последних. Продemonстрировано, что нанокластеры индуцировали более высокий уровень пермеабиллизации лизосомальных мембран в клетках Alexander и Huh7 по сравнению с нанокубами. Обсуждены различия в течении аутофагического потока и процессов пермеабиллизации лизосомальных мембран после воздействия наночастиц различных типов.

В выводах обобщены основные полученные результаты диссертационного исследования в виде отдельных пунктов. Изложенные

результаты в выводах свидетельствуют о достижении поставленной цели и решении сформулированных задач диссертационного исследования.

Научная новизна, научная и практическая значимость

В рамках диссертационного исследования впервые проведён многосторонний анализ взаимодействия наночастиц оксидов железа различной формы и размеров с набором клеточных культур человека Alexander, HepG2, Huh7 и Jurkat в условиях *in vitro*. Установлена взаимосвязь формы наночастиц (при одинаковых размерах / химическом составе) и характера клеточного ответа. Показано, что наночастицы в виде нанокубов способны индуцировать слабую пермеабиллизацию лизосомальных мембран, приводящую к аутофагии в клеточных линиях Alexander и Huh7. Экспериментально подтверждено, что повышенный уровень экспрессии Bcl-2 в клетках HepG2 ингибирует процессы аутофагии и при воздействии нанокубов и нанокластеров, что приводит к активации апоптических процессов в клетках.

Таким образом, диссертационная работа Пшеничникова С.Е. может быть охарактеризована как исследовательский труд высокого уровня. Диссертант применял современные практические (лабораторные) и исследовательские методы для получения воспроизводимых результатов исследования, проводил статистическую обработку полученных данных. В ходе исследования использованы методы клеточной и молекулярной биологии, а также микроскопии, которые дополняют друг друга и дают разностороннее представление о представленных в работе результатах. Диссертация обладает стройностью изложения, внутренней логикой и хорошо проиллюстрирована. Выносимые на защиту положения, подтверждены результатами диссертационного исследования. Результаты исследований Пшеничникова С.Е. опубликованы в виде 15 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных научного цитирования (Web of Science, Scopus или РИНЦ) и 12 тезисов и материалов конференций (в т.ч. 2 тезисов, индексируемых РИНЦ).

Замечания и вопросы

— Не ясно, как были получены наночастицы? Какие методические подходы применялись для создания частиц разной формы - нанокубов и нанокластеров? Почему в качестве покрытия использовали допамин, а не другие покрытия?

— Исследовали только форму, состав и размеры наночастиц. Есть набор параметров наночастиц, использующихся для их характеристики, в том числе стабильность, способность к образованию агрегатов и агломератов и т.д.

На рисунке с изображениями наночастиц четко видны их агрегаты и агломераты. Это касается немодифицированных частиц и частиц с покрытием.

— Нельзя интернализацию наночастиц относить к механизмам цитотоксичности! Интернализация - это поглощение клеткой внеклеточного материала. Интернализация НЧ может происходить по механизмам эндоцитоза, диффузии, через дефекты в мембранах.

— Автор пишет, что "для подтверждения процесса интернализации НЧМ в клетки Jurkat был использован метод проточной цитометрии с использованием красителя пропидиум йодида". Пропидиум йодид используется для обнаружения мертвых некротических клеток с нарушенной мембраной. Далее автор пишет: "При изучении данного процесса были четко выделены две клеточные субпопуляции." Не расшифровывается, что имеется в виду. Одни клетки стали гигантами, так как в них попали НЧ, а другие клетки - мелкие?

— Изучалось ли вообще действие магнитного поля без применения наночастиц на жизнеспособность и генерацию АФК клеток? Что такое положительный контроль?

— Автором описаны опыты по определению активности каспазы-3. Автор пишет, что после воздействия НЧ клетки были проинкубированы с ингибитором каспаз, а потом описывает активацию каспазы-3. Не ясно, как в этих условиях эта каспаза активируется. Не ясно, что на рисунке в этом случае является положительным контролем.

— Не раскрыт смысл термина "липидация" при исследовании аутофагии. Многие эксперименты проведены с использованием высокоэффективных микроскопических методов анализа, но количественные показатели процессов клеточной гибели не исследованы.

— Какие механизмы и пути реализации апоптоза инициируются преимущественно в опухолевых клетках: митохондриальный, лизосомальный? Возможна ли активация других механизмов и путей апоптоза?

Заключение

Диссертационная работа Пшеничникова С.Е. выполнена на актуальную научно-исследовательскую тематику, обладает научной новизной, теоретической и практической значимостью, а также является завершенным научным трудом. Диссертация соответствует требованиям и критериям, предъявляемым «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., ред. №62 от 05.01.2024 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Пшеничников Станислав Евгеньевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент:

Заведующий кафедрой
биофизики и биотехнологии,
ФГБОУ ВО «ВГУ», профессор,
заслуженный деятель науки РФ,
д.б.н.

Артюхов Валерий Григорьевич

Подпись

06.12.2024

Контактные данные:

+7(473) 220-85-86 artyukhov@bio.vsu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы:

394018 г. Воронеж, ул. Университетская площадь, 1

Почтовый адрес:

394018 г. Воронеж, ул. Университетская площадь, 1

+7 (473) 220-75-21 office@main.vsu.ru

