

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Каршиевой Саиды Шамильевны 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

В диссертационной работе Пшеничникова С.Е. исследуются аспекты применения наночастиц оксидов железа для активации процессов клеточной смерти. Наночастицы оксидов железа является перспективными материалами для применения в областях наномедицины, бионанотехнологии и биомедицины, однако потенциал их применения лимитирован существующими ограничениями – потенциальной цитотоксичностью и недостаточностью знаний о путях взаимодействия наночастиц с клетками человека. В рамках диссертационной работы проведены научные исследования о взаимодействии наночастиц оксидов железа различных форм с клеточными культурами Т-лимфобластного лейкоза, карциномы человека и моноклеарных клеток периферической крови. В работе детально показаны различия характера клеточного ответа, в зависимости от используемой разновидности наноматериала.

Данная работа имеет большое теоретическое значение в контексте понимания взаимодействия наноматериалов с биологическими структурами. С практической точки зрения диссертационная работа создает основы для разработки инструментов направленной индукции процессов клеточной смерти (например, апоптоза или аутофагии), что может быть использовано для разработки противоопухолевых препаратов и/или модификации уже существующих в настоящее время противораковых методов.

В диссертации рассмотрен и исследован подход по усилению токсических характеристик наночастиц с использованием магнитных полей. Описан концентрационно-зависимый характер цитотоксического эффекта наночастиц оксидов железа по отношению клеточным культурам Jurkat, Huh7, Alexander, Huh7 и моноклеарных клеток человека. Исследованы особенности внутриклеточной локализации наночастиц и особенности пермеабиллизации лизосомальных мембран. Также в работе в ходе экспериментов обнаружено, что генетические особенности клеток, в частности интенсивность экспрессии Bcl-2, имеет критическое значение для судьбы клеток, после взаимодействия с наночастицами оксидов железа.

Таким образом, диссертация Пшеничникова С.Е. расширяет теоретические основы о взаимодействии наноматериалов с клеточными культурами в условиях *in vitro*, а также создает практические предпосылки для разработки инструментов индукции процессов клеточной смерти в опухолевых клетках человека. Данная диссертационная работа посвящена актуальной теме исследования и существенно дополняет понимание о клеточных механизмах, задействованных в формировании клеточного ответа, что является перспективной основой для разработки инструментов для применения в бионанотехнологии и наномедицине.

Оценка содержания работы, её завершенность.

Диссертация состоит из 116 страниц машинописного текста и включает: список сокращений, введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, результаты и обсуждение, выводы и список литературы. Список литературы включает 201 наименование, в том числе 195 на иностранном языке. Текст диссертации включает 30 рисунков. Работа имеет логичную структуру, обладает внутренним единством и оформлена в соответствии с требованиями ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Во введении описана актуальность диссертации, показаны цель и задачи исследования, обоснованы научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость работы. Отдельно приведена информация об апробации результатов диссертационного исследования на научных конференциях и приведен список публикаций по теме диссертационной работы. Вынесены научные положения, выносимые на защиту.

В первой главе (обзор литературы) описаны современные научные представления о наночастицах оксидов железа как инструментах биотехнологии (бионанотехнологии) и биомедицины, а также существующие ограничения использования наночастиц. Подробно описаны выделяемые в настоящее время основные формы клеточной смерти, а также возможности по индукции процессов клеточной смерти с использованием наночастиц оксидов железа.

Во второй главе (объекты и методы исследования) в деталях описаны объекты исследования – клеточные культуры и три разновидности наночастиц. Также подробно описаны методики и протоколы, использованные в диссертации.

В третьей главе (результаты и обсуждение) выделено две подглавы:

Подглава 3.1 посвящена исследованию воздействия наночастиц оксидов железа на клеточную культуру Jurkat и мононуклеарных клеток

крови человека. Представлены результаты измерения цитотоксичности наночастиц, процессов их интернализации в клетки и зарегистрирован, сопряженный с этим процессом, рост гранулярности экспериментальных клеток. Проведено сравнение данных клеточной жизнеспособности, полученных с использованием спектрофотометрического метода и метода проточной цитометрии. Измерен уровень оксидативного стресса в клетках, после воздействия наночастиц.

Подглава 3.2 посвящена комплексной оценке воздействия наночастиц оксидов железа, обладающих одинаковым составом, но различной формой на клеточные культуры Alexander, HepG2 и Huh7. Подглава включает три раздела:

Раздел 3.2.1 включает результаты исследования цитотоксических характеристик двух видов наночастиц – нанокубов и нанокластеров. Показан прямой дозозависимый характер цитотоксического эффекта исследованных наночастиц. С использованием методов микроскопии выявлен ряд внешних апоптотических признаков у клеток, после продолжительного воздействия нанокубов и нанокластеров.

Раздел 3.2.2 посвящен исследованию воздействия наночастиц на морфологию и функциональность митохондрий экспериментальных клеток, а также анализа течения аутофагии и апоптоза в клетках. Показаны различия в процессах липидизации маркера аутофагии LC3 в клетках, после воздействия наночастиц, в зависимости от генетических особенностей клеточной культуры. С использованием конфокальной микроскопии показано, что нанокубы индуцируют образование аутофагосом в клетках Alexander и Huh7 после 24 ч воздействия. Тем временем в нанокластеры приводят к апоптозу во всех типах экспериментальных клеток.

Раздел 3.2.3 включает описание процессов прогрессивной пермеабилзации лизосомальных мембран, индуцированных воздействием нанокубов и нанокластеров. Анализ морфологии лизосом, а также обнаруженный факт локализации интернализированных наночастиц в лизосомах позволили подтвердить факт лизосомальной утечки в цитозоль, что является сильным активатором процессов клеточной смерти. Также в разделе представлено обсуждение в течении процессов аутофагии и апоптоза, в зависимости от используемых наночастиц и особенностей клеток.

Выводы обобщают основные результаты диссертационного исследования. Представленные выводы подтверждают выполнение поставленной цели и решении сформулированных задач диссертации. Выводы и результаты работы основаны на воспроизводимых данных, полученных экспериментальным путем.

Научная и практическая значимость

Диссертация Пшеничникова С.Е. является научным трудом, расширяющим современные представления в области взаимодействия клеточных культур в условиях *in vitro* с наночастицами оксидов железа. Результаты, полученные с использованием актуальных практических и экспериментальных методов, предоставляют разностороннее представление об особенностях индукции процессов клеточной смерти с использованием наноматериалов. Диссертационная работа имеет внутреннюю логику, а представленные на защиту положения, подтверждены воспроизводимыми результатами диссертационного исследования. Результаты исследований по теме диссертации апробированы на международных и Российских конференциях в виде 12 тезисов и материалов конференции, а также в виде 3 статей в научных журналах, индексируемых системами цитирования Web of Science, Scopus или РИНЦ.

Аннотация, выполненный на 22 страницах, отражает основные положения и выводы диссертации. Аннотация соответствует требованиям по содержанию и оформлению, выдвигаемым ВАК РФ.

Замечания и вопросы

К диссертационной работе имеется ряд вопросов и замечаний.

1) Необходимо обосновать выбор одного из биологических объектов исследования - мононуклеарных клеток периферической крови человека.

2) Рекомендую дополнительно пояснить как форма наночастиц влияет на характер клеточного ответа.

3) Вопрос – каких российских исследователей вы могли бы порекомендовать в вашей области исследования (по теме диссертации)?

4) Замечание по оформлению – на рис. 19 используется термин на иностранном языке без перевода

5) В списке литературы приведено мало ссылок на работы отечественных авторов.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают общего высокого уровня выполнения диссертационной работы.

Заключение

Проведенный анализ материалов работы, обсуждения и интерпретации полученных результатов, выводов работы позволяет заключить, что диссертация Пшеничникова С.Е. «Применение наночастиц оксидов железа

для индукции процессов регулируемой клеточной смерти», представленная на соискание степени кандидата биологических наук является самостоятельной и завершенной научно-квалификационной работой. Выполненная диссертация полностью соответствует требованиям «Положения 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 и паспорту специальности 1.5.6. «Биотехнология». Автор диссертации Пшеничников Станислав Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент:

старший научный сотрудник,
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, к.б.н.

Каршиева Саида Шамильевна Подпись



«09» 12 2024 г.

Контактные данные:

+7(903) 008-27-92 skarshieva@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

14.00.14 – онкология

Адрес места работы:

115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

Почтовый адрес:

115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

+ 7 499 444 24 24 info@ronc.ru

Подпись с.н.с. лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России к.б.н. Каршиевой С.Ш. заверяю.

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, к.б.н.



Бармашов А.Е.