

ОТЗЫВ

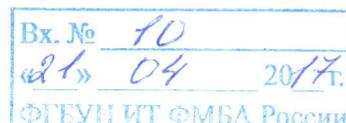
официального оппонента

д.б.н., профессора Сычевой Людмилы Петровны на диссертационную работу Новикова Михаила Александровича «**Экспериментальная оценка особенностей токсического действия серебросодержащих нанобиокомпозитов**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 – Токсикология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационного исследования. В связи с интенсивным развитием информационно-коммуникационных, медицинских и других современных технологий значительно выросло производство наноматериалов. При этом отстает оценка их безопасности для здоровья человека. В существующем многообразии наноматериалов значительную часть составляют наночастицы металлов, в частности наносеребро. Серебро является одним из самых известных антисептических средств, и в наноформе оно сохраняет эти свойства. Замена серебра в макроформе на наносеребро позволяет снизить действующие дозы, и, соответственно удешевить препараты, сделать их доступными для лечения многих инфекционных заболеваний. В то же время получены данные о токсичности наночастиц серебра, в том числе для половых клеток. В окружающей среде отмечена их высокая стабильность и способность сохранять токсические свойства на протяжении нескольких лет. Для снижения подобных негативных эффектов чистого наносеребра создаются наноконпозиты, обладающие большей стабильностью. Так, в Иркутском институте химии им. А.Е.Фаворского СО РАН синтезированы более стабильные нанобиокомпозиты на природной и синтетической полимерных матрицах – арабиногалактан (АГ) и поли-1-винил-1,2,4-триазол (ПВТ). Эти соединения требуют новых подходов к оценке токсичности в связи с целым рядом свойств, присущих наноматериалам, диктуют необходимость изучения механизмов и общих закономерностей их воздействия на организм на клеточном и субклеточном уровнях. В связи с этим выбранное автором направление исследований безопасности наноконпозитов с использованием комплекса токсикологических, биохимических, гистологических, гистохимических электронно-микроскопических методов и формирование алгоритма экспериментальной оценки их нейротоксических свойств свидетельствует о высокой значимости и актуальности данной работы.

Научная новизна полученных результатов заключаются в получении новых данных о механизме действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерные матрицы, на ткань головного мозга экспериментальных животных.

Проведёнными исследованиями доказаны нарушения клеточной и субклеточной организации нейронов при введении нанобиокомпозита на природной матрице АГ. Установлено, что аргентумарабиногалактан (нАГ)



вызывает активацию апоптоза в нейронах, нарастающего с течением времени и сопровождающегося увеличением экспрессии белков bcl-2 и caspase-3. В то же время, углубленное исследование наносеребра на синтетической полимерной матрице ПВТ не выявило таких эффектов.

Автором впервые получены данные о способности наночастиц серебра, инкапсулированных в природную матрицу, проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), накапливаться в нервной ткани, вызывать нарушения её структуры, характеризующиеся длительно сохраняющимися дистрофическими изменениями нейронов коры головного мозга.

В качестве важной особенности этой работы следует отметить сравнение двух форм нанобиокompозитов серебра, одна из которых оказалась не токсичной в отличие от другой – с явно выраженной токсичностью. Эти отличия указывают направление дальнейших химико-биологических исследований для определения причин этих отличий и поиска препаратов двух линий: проникающих через ГЭБ, что бывает необходимо при лечении нейрогенераторных заболеваний, и препаратов другого типа – не проходящих через барьер и безопасных для структур мозга.

Структура и объем диссертации. Работа написана в классическом стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырёх глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и списка сокращений. Диссертация изложена на 135 страницах, иллюстрирована 21 таблицами и 58 рисунками. Список литературы включает 207 источников, в том числе 137 иностранных.

Во введении обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, представлены положения, выносимые на защиту.

Аналитический обзор литературы изложен достаточно полно и охватывает современные аспекты изучаемой проблемы: характеристику наносеребра как перспективного и широко внедряемого в сферу жизнедеятельности человека препарата; апоптоз, как важный биологический процесс регуляции токсических эффектов на молекулярном и клеточном уровнях; АГ и ПВТ, как перспективные полимерные матрицы для создания нанобиокompозитов медицинского назначения; методические подходы к токсико-гигиенической оценке действия наночастиц на современном этапе.

В обзоре литературы представлен анализ суждений различных авторов, свежие современные публикации по проблеме, что свидетельствует об эрудиции автора и его способности к аналитической работе. Знание литературы позволило автору выявить неизученные аспекты проблемы, сформулировать цель и задачи собственного диссертационного исследования.

Глава 2 «Материалы и методы обследования» состоит из пяти разделов, описывающих токсикологические, морфологические, иммуно-

гистохимические, электронно-микроскопические и статистические методы исследования. Дизайн исследования и выбор методов соответствуют поставленным цели и задачам.

Результаты собственных исследований описаны в четырех главах: 3 и 4 посвящены токсикологическим экспериментам с наносеребром на природной и синтетической матрицах, в 5 главе проведено сравнение исследуемых нанобиокомпозитов, в 6 главе обоснован алгоритм изучения их нейротоксичности. Автор последовательно описывает полученные в процессе работы данные, проводит их сравнительный анализ и делает обоснованные заключения.

В главе 3 отражены изменения в биохимическом статусе крыс при действии аргентумарабиногалактана: активация защитных звеньев антиоксидантной системы при неизменном уровне конечных продуктов перекисного окисления липидов. По результатам исследования среднесмертельной дозы вещество отнесено к IV классу опасности как малоопасное вещество. В то же время исследование двух доз нанобиокомпозита указывает на негативные эффекты вещества: увеличение периваскулярных пространств, расширение проводящих волокон, набухание миоцитов и эндотелиоцитов сосудов, утолщение стенки артерий, появление большого количества тёмных нейронов, нарушение их ультраструктуры. На ранних этапах после воздействия нанобиокомпозита в дозе 100 мкг/кг отмечена начальная дисрегуляция механизмов программированной клеточной смерти, которая в отдаленном периоде дожития приводит клетки к активации апоптоза.

В главе 4 представлены материалы изучения синтетического полимера аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазола. Результаты свидетельствуют о низкой степени воздействия нанобиокомпозита в различных дозировках на организм. Исследования экспрессии белков не выявили каких-либо изменений, свидетельствующих об активации апоптоза в нервных клетках. Результаты определения среднесмертельной дозы с учетом данных молекулярно-клеточного исследования позволили обоснованно отнести аргентумполи-1-винил-1,2,4-триазол к IV классу как малоопасное вещество.

В главе 5 «Сравнительная оценка биологических эффектов действия исследуемых нанобиокомпозитов» убедительно показано, что нарушения клеточной и субклеточной организации нейронов, выявляются только при введении нанобиокомпозита на природной матрице арабиногалактан.

В главе 6 обоснован алгоритм по изучению нейротоксичных свойств нанобиокомпозитов на клеточном и субклеточном уровнях, включающий оценку нарушений морфологической структуры головного мозга у крыс, экспрессии белков модуляторов апоптоза bcl-2 и caspase-3 в нейронах головного мозга. С большим удовлетворением отмечаю рассуждения автора о некорректности имеющегося традиционного подхода к характеристике веществ, как малоопасных только на основании изучения интегральных

параметров токсикометрии, без углубленного изучения процессов на клеточном и молекулярном уровнях.

Соответствие полученных результатов поставленной цели и задачам. Полученные автором результаты соответствуют четко поставленной цели и задачам. Научные положения, выносимые на защиту, и выводы логично сформулированы в соответствии с содержанием работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации не вызывает сомнений. Обоснованность и достоверность научных положений подтверждаются корректным планированием экспериментов, тщательным подходом к формированию групп, достаточным количеством включенных в исследования биологических объектов, использованием высокоинформативных современных методов исследования, подробным анализом данных и сопоставлением собственных результатов исследований с данными литературы, а также адекватной статистической обработкой.

Рекомендации и заключения обоснованы и обсуждены в большом количестве публикаций, при широком представлении материалов на Всероссийских и международных научно-практических конференциях, съездах и конгрессах, в том числе по нанотоксикологии.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации. Данное диссертационное исследование, посвященное решению конкретных вопросов оценки токсичности двух наноматериалов, поднимает важные теоретические вопросы о необходимости токсикологической оценки факторов окружающей среды не только по интегральным токсикометрическим параметрам, но при обязательном изучении их влияния на молекулярные и клеточные структуры модельных организмов. Особенно, если это касается малоизученных факторов, таких как наноматериалы.

Определенные выводы можно сделать и при оценке результатов сравнения двух нанобиокомпозитов. Основным компонентом обоих является наносеребро. Однако автор показал, насколько разное действие это вещество оказывает в зависимости от вида носителя. Этот факт указывает на необходимость углубленной оценки всех новых наноматериалов, даже при небольших модификациях их физико-химических свойств.

Работа поднимает важные вопросы биологии о соотношении биологических процессов на разных уровнях организации, о патогенезе развития отдаленных последствий при действии антропогенных факторов, о доклинических проявлениях патологии, что является чрезвычайно важным в системе профилактических мероприятий.

С позиции использования результатов работы для практики следует отметить разработанный автором алгоритм экспериментальной оценки нейротоксических свойств нанобиокompозитов с учетом интенсивности апоптоза. Он может найти широкое применение для скрининга и оценки токсичности и безопасности вновь синтезируемых в огромном количестве наноматериалов с разными свойствами, назначением, на разных носителях.

Результаты диссертационной работы легли в основу разработки патента «Способ оценки токсического действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу арабиногалактана, на ткань головного мозга лабораторных животных в отдалённом периоде воздействия», (№ 2578545 от 27.03.2016). Материалы исследования реализованы в учебном процессе кафедры общей гигиены ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России и используются в педагогической и научной деятельности учебно-образовательного центра ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований». Все документы подтверждены соответствующими свидетельствами и актами внедрения.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации. Автореферат базируется на результатах диссертационного исследования, его содержание полностью соответствует содержанию диссертации.

При рассмотрении диссертации возникли вопросы:

1. Чем обоснован выбор доз 100 и 500 мкг/кг нанобиокompозитов, которые входят также в алгоритм оценки нейротоксичности?
2. Как автор объясняет выявленное повышение активности антиоксидантной системы при отсутствии изменения ПОЛ, если оба процесса, как правило, индуцируются свободными радикалами (их образование установлено при действии наноматериалов)?

В качестве замечаний отмечу следующие аспекты:

1. Вывод 6 имеет большое значение, но сформулирован не четко, имеет в большей степени описательный характер.
2. Алгоритм по оценке нейротоксичных свойств нанобиокompозитов, содержащих наносеребро, составлен очень детально вплоть до указания типа среды для гистологических препаратов как «гомогенизированной парафиновой среды для гистологических исследований HistoMix (BioVitrum, Россия), или, например, использования камеры Olympus E420. Можно предположить, что при отсутствии именно этой среды или именно этой камеры алгоритм не будет работать. Несущественные подробности значительно увеличили объем алгоритма и не позволили представить его в автореферате. Оптимальным было бы отразить этот алгоритм в виде наглядной схемы.

Однако данные замечания не являются принципиальными и не снижают высокой значимости выполненной работы.

Заключение

Диссертационное исследование Новикова Михаила Александровича «Экспериментальная оценка особенностей токсического действия серебросодержащих нанобиокмполитов», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 – Токсикология (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой, посвященной решению актуальной для токсикологии научной задачи, направленной на совершенствование проблемы оценки воздействия наноструктурированных веществ и препаратов на организм человека, в том числе и в отдалённом периоде воздействия. По своей научной новизне, методическому решению цели и задач исследования, практической и теоретической значимости полученных результатов, степени обоснованности научных положений и выводов, представленная диссертационная работа М.А.Новикова соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями, утвержденными постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 – Токсикология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России

доктор биологических наук, профессор

Людмила Петровна Сычева

Подпись ведущего научного сотрудника ФГБУ

«Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»

Л.П. Сычевой подтверждаю:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, заведующий Научно-

организационным отделом, к.м.н.



Евгений Владимирович
Голобородько

Сведения о лице, представившем отзыв на диссертацию:

Сычева Людмила Петровна

Почтовый адрес: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46

Телефон: рабочий 8-499-190-95-54 (лаборатория); мобильный 8(905)701-71-08

e-mail: lpsycheva@mail.ru

сайт: <http://www.fmbafmbs.ru>

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)

Должность: ведущий научный сотрудник

Число 12 04 2017 г.