

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Межевикиной Людмилы Михайловны, на диссертационную работу Сергушкиной Марты Игоревны «Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому стрессу в присутствии полисахаридов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Сергушкиной Марты Игоревны посвящена изучению физиологической устойчивости клеток крови человека (лейкоциты, тромбоциты) при охлаждении до низких отрицательных температур (-20° ; -80°C) в криозащитных средах с полисахаридами. Проблема сохранения биологических объектов вне организма человека и животных в условиях холодового стресса до сих пор остается открытой. Эффективным способом ее решения считается введение клеток в состояние обратимого холодового анабиоза. В настоящее время определены основные приемы повышения устойчивости клеток к холодовому стрессу, включающие обязательное использование криопротекторов для снижения негативного влияния охлаждения на жизнеспособность клеток. Однако эффективные криопротекторы проникающего действия (диметилсульфоксид, глицерин, этиленгликоль и др.) представляют собой органические растворители, токсичные для клеток при физиологических температурах. После оттаивания их необходимо удалять из биологической среды. Таким образом, существует острая потребность в изучении новых биосовместимых веществ с потенциальной криозащитной активностью, способных влиять на физиологическую устойчивость клеток при отрицательных температурах. Перспективными компонентами криозащитных сред являются полисахариды растений и грибов, обладающие выраженным антиоксидантным действием, что в условиях холодового стресса имеет особое значение.

В связи с этим актуальность представленной работы не вызывает сомнения и определяется тем, что она посвящена изучению закономерностей и механизмов функционирования клеток организма человека в условиях негативного воздействия отрицательных температур. Решение данного вопроса позволит в дальнейшем раскрыть механизмы поддержания внутренней среды всего организма в условиях холодового воздействия различной интенсивности, что в связи с повышенным вниманием к освоению территорий Крайнего Севера России обеспечит сохранность здоровья людей, осваивающих северные регионы.

Научная новизна работы

Научная новизна результатов, представленных Мартой Игоревной Сергушкиной в своем диссертационном исследовании, заключается в открытии избирательного характера влияния полисахаридов на температуру замерзания растворов криопротекторов. Впервые показано, что полисахариды способствуют снижению температуры в присутствии глицерина, но не влияют на температуру замерзания растворов диметилсульфоксида, диметилацетамида и 1,2-пропандиола.

На примере лейкоцитов и тромбоцитов крови человека впервые продемонстрирована эффективность комбинирования в замораживаемой клеточной среде глицерина и полисахарида, что обеспечивает повышение физиологической устойчивости используемых биологических объектов к действию отрицательных температур (-20° ; -80°C), а также позволяет снизить токсичность ограждающего криозащитного раствора, путем снижения концентрации глицерина.

Автором предложена гипотеза о совместном криозащитном действии глицерина и полисахарида. Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому стрессу может быть обусловлена способностью полисахарида к комплексообразованию с молекулами воды и глицерина, что при охлаждении биологической среды обеспечивает эффективную дегидратацию, упорядоченное кристаллообразование и предупреждает критические изменения в мембранах клеток.

Научно-практическая значимость полученных результатов

Представленные в диссертационной работе результаты имеют несомненно важное теоретическое значение для фундаментальной физиологии и направлены на расширение представлений о механизмах повышения устойчивости клеток к факторам холодового стресса, а также на выявление роли полисахаридов растений и грибов в обеспечении жизнеспособности биологических объектов, подвергнутых замораживанию. Полученные автором данные рекомендуется использовать при разработке новых способов криоконсервирования биологических объектов для учреждений заготовки и длительного хранения материала в качестве альтернативы жидкоазотной технологии.

Материалы диссертационного исследования также используются при реализации дисциплин направления подготовки 06.03.01 Биология и 44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки - биология, химия) в ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет» (акт внедрения от 01.03.2023), а также в научно-исследовательской работе лаборатории клеточных технологий ФГБУН Кировского НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России для разработки новых методов

криоконсервирования клеточных суспензий, востребованных в современной трансфузионной медицине (акт внедрения от 17.03.2023 г.).

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций

Все научные положения, выводы и рекомендации, содержащиеся в диссертационной работе Марты Игоревны Сергушкиной, сформулированы на основе тщательно выполненного теоретико-методологического анализа данных, полученных в ходе проведения исследований с применением современных методов сбора и обработки информации, а также адекватных методов статистического анализа. Анализ большого количества современных научных данных и использование отвечающих поставленным целям и задачам методов исследования с большой степенью достоверности обосновывают выносимые на защиту положения.

Результаты диссертационного исследования широко и всесторонне апробированы в рецензируемой печати и на конференциях различного уровня. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 9 - в высокорейтинговых журналах, рецензируемых научными системами Scopus и Web of Science, что говорит о высокой оценке и признании значимости полученных результатов мировым научным сообществом.

Структура и содержание диссертации

Название, выбранное автором для диссертационной работы, отражает ее содержание и соответствует изложенному в рукописи материалу. Диссертация выполнена и оформлена в соответствии с требованиями ВАК Минобрнауки РФ, построена по классическому плану и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Библиографический список включает 309 источников научной литературы, 256 из которых представлены в зарубежных базах, посвящённых изучению механизмов криповреждений клеток и способам криозащиты, а также физиологическим свойствам полисахаридов и их возможной роли в повышении устойчивости клеток к холодовому стрессу. Текст диссертации изложен на 129 страницах, иллюстративный материал включает 9 рисунков и 16 таблиц.

Во введении автор раскрывает актуальность темы исследования и степень ее разработанности, определяет цель и формулирует задачи исследования, решению которых посвящена диссертационная работа. Помимо этого, во введении обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, легитимность исследования, методология и методы, основные научные положения, степень достоверности полученных результатов и личный вклад автора, а также представлены данные по публикациям и апробации материалов диссертации, соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Обзор литературы изложен достаточно подробно и понятно, хорошо структурирован и даёт информацию о современных теориях и концепциях криповреждений клеток, физиологической активности и структуре полисахаридов, их роли в повышении устойчивости биологических объектов к охлаждению. Полезным представляется раздел о практическом использовании полисахаридов в качестве компонентов криозащитных сред, в котором автор рассматривает и оценивает приоритетные работы своих коллег, выполненные по данному направлению в Институте физиологии Коми НЦ УрО РАН, что подтверждает целесообразность проведения настоящего исследования и способствует лучшему пониманию представленных в диссертации результатов.

В целом, в обзоре литературы Марта Игоревна суммирует накопленные данные по ключевым вопросам криофизиологии, обосновывает актуальность темы диссертации и необходимость проведения исследований.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит подробное описание объектов исследования (лейкоциты и тромбоциты донорской крови человека), протекторов проникающего действия, полисахаридов, а также современных методов криофизиологии, условий проведения экспериментов, оборудования и программного обеспечения для анализа полученных данных. Для решения поставленных задач применены методы определения температуры замерзания защитных растворов в сравнении с температурой замерзания чистого растворителя, а также методы выявления структурно-функционального состояния клеток.

Морфология и соотношение разных популяций лейкоцитов, микродефекты в клеточных мембранах и жизнеспособность клеток оценены с помощью световой микроскопии и цитохимических методов. Фагоцитарная активность нейтрофилов исследована по поглотительной способности инертных частиц латекса. Для определения агрегационной способности тромбоцитов при ее индуцировании АДФ или адреналином использован турбидиметрический метод, позволяющий регистрировать максимальную

величину светопропускания (показатель степени агрегации) и средний размер агрегатов. Представленные в работе методы исследования, полностью соответствуют поставленным в диссертационной работе задачам и указывают на высокий методический уровень работы.

Глава «Результаты исследований» содержит материалы экспериментальных исследований, которые разделены автором на 3 части, выстроенные в соответствии с логикой настоящей работы.

Первый раздел посвящен изучению температуры замерзания воды в растворах криопротекторов и биологических жидкостях в присутствии полисахаридов. Автор приводит убедительные данные о том, что полисахариды не оказывают влияния на температуру кристаллизации воды. При этом они способны смещать температуру замерзания в область более низких значений в водных растворах глицерина (исключение – коммерческий пектин Зостеран морской *Zostera marina* L.). В биологической среде полисахариды в присутствии глицерина сдвигают температуру кристаллизации в область более высоких температур.

Второй и третий разделы настоящей главы посвящены детальному описанию параметров сохранности структурно-функционального состояния ядродержащих клеток и тромбоцитов периферической крови человека, перенесших воздействие отрицательных температур -20° и -80°C под защитой классических криопротекторов, полисахаридов и при их комбинировании. Из представленных результатов следует, что для длительного хранения лейкоцитов и тромбоцитов целесообразно использовать низкие температуры (-80°C) и пектиновый полисахарид AU-701 в качестве добавки к основному протектору глицерину.

Результаты собственных исследований автора изложены подробно, статистически обработаны и не вызывают сомнений.

В главе «Обсуждение результатов» Марта Игоревна обобщает полученные данные, характеризующие структурно-функциональное состояние ядродержащих клеток и тромбоцитов человека, подвергшихся воздействию отрицательных температур, объясняет положительный эффект комбинирования криопротектора глицерина с полисахаридом в составе замораживаемой среды.

Обсуждение полученных результатов проведено грамотно с привлечением современных источников литературы, подчеркнуты перспективы использования полисахаридов для повышения физиологической устойчивости биологических объектов к холодному стрессу.

Основные итоги диссертационной работы сведены к 5-ти обоснованным выводам, которые в полной степени отражают содержание диссертации и соответствуют поставленным задачам.

Завершают диссертационную работу практические рекомендации по использованию полученных результатов при разработке новых способов длительного хранения биологических объектов в состоянии холодового анабиоза при температурах электрических морозильников (-20° ; -80°C) и под защитой новых комбинированных и низкотоксичных консервантов на основе глицерина и полисахарида.

Диссертационная работа производит благоприятное впечатление и принципиальных замечаний не вызывает. Однако после прочтения диссертации возникло несколько вопросов, требующих дополнительного пояснения:

1. На стр. 74 указано, что «полисахариды многообразны, у них нет постоянной структуры, она меняется в зависимости от особенностей собранного материала, от способа получения полисахарида». Возникает вопрос, чем обусловлен выбор использованных в работе полисахаридов? Возможно ли воспроизведение полученных результатов при использовании другого способа выделения полисахаридов?
2. В обзоре литературы отмечено, что многие полисахариды обладают выраженным иммуностимулирующим действием. Как вы полагаете, может ли стимуляция клеток перед замораживанием, в частности лейкоцитов, отразиться на их жизнеспособности после отогрева?
3. Чем можно объяснить тот факт, что из всех исследованных в диссертации полисахаридов только яблочный пектин «AU-701» усиливает криозащитный эффект глицерина при отрицательной температуре -80°C ?

Оценивая материалы диссертации в целом, следует отметить, что в результате проведенных исследований Марта Игоревна Сергушкина ответила на все поставленные в работе вопросы и получила новые данные о закономерностях функционирования клеток организма человека при негативном воздействии отрицательных температур, предложила возможные стратегии повышения физиологической устойчивости биообъектов к факторам холодового стресса.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Сергушкиной Марты Игоревны «Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому стрессу в присутствии полисахаридов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 - Физиология человека и животных, является законченной научно-квалификационной работой, которая по актуальности темы, адекватности использованных методов, новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов соответствует критериям, указанным в разделе II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. от 18.03.2023 г.), а ее автор, Сергушкина Марта Игоревна, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

Официальный оппонент:

исполняющий обязанности руководителя лаборатории биологических эффектов электромагнитных, магнитных и акустических воздействий, ведущий научный сотрудник Института биофизики клетки - обособленного подразделения «Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», доктор биологических наук, специальность 03.01.02 - Биофизика

Межевикина Людмила Михайловна

ЛМ 04.04.2023г.

142290, Пушкино, Московская обл., ул. Институтская, дом 3,
ИБК РАН, тел.: +7(4967) 73-92-46; сот.: 8-916-438-34-32;
e-mail: mezhevikina@rambler.ru



Подпись

Межевикина Л.М.

Удостоверяю *Л.М.*

Л.М. 10.07.2023

В диссертационный совет Д 004.038.01

Института физиологии Коми научного центра

Уральского отделения Российской академии наук

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Федерального исследовательского центра

«Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

СВЕДЕНИЯ ОБ ОФИЦИАЛЬНОМ ОППОНЕНТЕ

По диссертации Сергушкиной Марты Игоревны «Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому стрессу в присутствии полисахаридов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных

№п/п	Фамилия, Имя, Отчество	Дата рождения	Основное место работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр и специальность, по которой была защищена диссертация	Основные работы в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет по профилю оппонируемой диссертации (не менее 3-х и не более 15)
1	Межевкина Людмила Михайловна	23.07.1950	Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение «Федерального исследовательского центра	Доктор биологических наук	03.01.02 – Биофизика	1. Межевкина, Л.М. Липосомальная EGFP-трансфекция мезенхимных клеток крупного рогатого скота: идентификация и морфофункциональные характеристики трансфицированных клонов in vitro. / Межевкина Л.М., Корниенко Е.В., Маленко Г.П., Лозинский В.И., Косовский Г.Ю. //

			<p>«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБК РАН, г. Пушкино), и.о. руководителя лаборатории биологических эффектов электромагнитных, магнитных и акустических воздействий, ведущий научный сотрудник ИБК РАН.</p>		<p>Биофармацевтический журнал, 2016, 8 (3), 13-20. (Scopus, РИНЦ)</p> <p>2. Khovankina, A.V. Features of cultivation of mesenchymal stromal cells from bone marrow of cattle on gelatin cryogel. / Khovankina A.V., Mezhevikina L.M., Kosovsky G.Yu. // Biotechnology, 2016, 231S, S69. (WOS)</p> <p>3. Межевикина, Л.М. Влияние регуляторных белков LIF, FGF и IL-2 на пролиферацию мезенхимных стволовых клсток костного мозга крупного рогатого скота in vitro. / Межевикина Л.М., Кашапова И.С. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология, 2017, 5, 92-99. (РИНЦ)</p> <p>4. Khramtsova, E.A. Proliferation and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Modified by the Neural Growth Factor (NGF) Gene. / Khramtsova E.A., Mezhevikina L.M., Fesenko E.E. // Biology Bulletin, 2018, 45 (3), 219-225. Doi: 10.1134/S1062359018030068 (WOS, Scopus)</p> <p>5. Smirnova, D.V. Cryopreservation of the human gut microbiota: Current state and Perspectives. / Smirnova D.V., Zalomova L.V., Zagainova A.V., Makarov V.V., Mezhevikina L.M., Fesenko E.E., Yudin S.M. // International Journal of Medical Microbiology, 2019, 309, 259-269. Doi: 10.1016/j.ijmm.2019.06.001 (WOS, Scopus)</p> <p>6. Решетников, Д.А. Адгезия и пролиферативная активность мезенхимных стромальных клеток человека (МСКч) и первичных эмбриональных фибробластов мыши (ПЭФм) при культивировании на полиэлектролитных нанопленках. / Решетников Д.А. Вершинина Ю.С., Межевикина Л.М. // Гены и клетки, 2019, 14 (4), 195. https://congress.regenerative-med.ru (Scopus)</p> <p>7. Заломова, Л.В. Эффективность консервации в</p>
--	--	--	--	--	---

жидком азоте микробиоты кишечника человека в зависимости от состава криозащитной среды / Заломова Л.В., Решетников Д.А., Угraitская С.В., Межевикина Л.М., Загайнова А.В., Макаров В.В., Юдин С.М., Фесенко Е.Е. (мл.) // Биофизика, 2020, 65 (5), 924-931. Doi: 10.31857/S0006302920050117(Scopus)

8. Mezhevikina, L.M. Ultrathin polyethyleneimine (PEI) films for culturing of the human mesenchymal stromal cells (hMSC) / Mezhevikina L.M., Reshetnikov D.A., Fomkina M.G., Fesenko E.E. // J. Cardiovascular Medicine and Cardiology, 2020, 7 (3), 255-261. Doi:10.17352/2455-2976.000148

9. Mezhevikina, L.M. Growth characterizations of human bone mesenchymal stromal cells at cultivation on synthetic polyelectrolyte nanofilms in vitro / Mezhevikina L.M., Reshetnikov D.A., Fomkina M.G., Appazov N.O., Ibadullayeva S. Zh., Fesenko E.E. // Heliyon, 2021, 7, 1-8, e06517 Doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06517 (Scopus, WOS)

10. Zalomova, L.V. Fetal Serum in Combination with 5% Dimethyl Sulfoxide Efficiently Protects the Human Gut Microbiota during Cryopreservation in Liquid Nitrogen / Zalomova L.V., Reshetnikov D.A., Ugraitская S.V., Mezhevikina L.M., Zagainova A.V., Makarov V.V., Yudin S.M., Fesenko E.E.Jr. // Biophysics, 2021, 66, 657-664. Doi: 10.1134/S0006350921040230 (Scopus)

Согласна на обработку персональных данных

Официальный оппонент

« 10 » июля 2023 г.

L.M.

Межевикина Л.М.

Подпись заверить по месту работы



Подпись
Межевикина Л.М.
 Удостоверяю
10.07.2023

ДИПЛОМ ЯВЛЯЕТСЯ ДОКУМЕНТОМ
ГОСУДАРСТВЕННОГО ОБРАЗЦА

Министерство образования и науки Российской Федерации
(Национальное образовательное учреждение высшего образования)

Приказ от 28 апреля 2012 г. № 141/нк-1

Решением
диссертационного совета

при Институте биофизики клетки РАН

от 27 октября 2011 г. № 8

Межевикиной Людмиле Михайловне
(Ф.И.О.)

ПРИСУЖДЕНА УЧЕНАЯ СТЕПЕНЬ

ДОКТОРА

биологических наук

ДДН № 020276 *

С.В.Иванец
(Ф.И.О.)

г. МОСКВА



На правах рукописи

Межевкина Людмила Михайловна

**РОЛЬ ЛЕЙКЕМИИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ФАКТОРА В ПРОЦЕССАХ
РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК И В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Пушино - 2011



Копия верна _____
Ведущий специалист по кадрам А.П. Бескородова
«В» 11/01/11 2011

В диссертационный совет Д 004.038.01

По защите докторских и кандидатских диссертаций

При ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН

СОГЛАСИЕ

Я, Межевикина Людмила Михайловна, доктор биологических наук, и.о. руководителя лаборатории биологических эффектов электромагнитных, магнитных и акустических воздействий, ведущий научный сотрудник Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований» (ИБК РАН, г. Пушино) согласна выступить официальным оппонентом по диссертации Сергушкиной Марты Игоревны «Физиологическая устойчивость лейкоцитов и тромбоцитов к холодовому стрессу в присутствии полисахаридов», представленной на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

По теме рассматриваемой диссертации имею научные работы за последние пять лет, опубликованные или цитированные в журналах WOS, Scopus, PubMed и журналах из списка ВАК.

Не являюсь государственным (муниципальным) служащим, членом ВАК, членом диссертационного совета, принявшего диссертацию к защите, соавтором соискателя ученой степени (научного руководителя, консультанта) по опубликованным работам по теме диссертации, работником (в том числе работающим по совместительству) организаций, где выполнялась диссертация или работает соискатель ученой степени, его научный руководитель или научный консультант, а также где ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соискателем).

Я, как субъект персональных данных, согласен на их обработку. Оператор обработки персональных данных: Высшая аттестационная комиссия при Министерстве образования и науки Российской Федерации, Департамент аттестации научных и научно-педагогических работников Министерства образования и науки Российской Федерации, Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения российской академии наук» (сбор, систематизация, накопление, хранение уточнение (обновление, изменение), уничтожение персональных данных).

Цель обработки персональных данных: оппонирование диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных, биологические науки.

Перечень персональных данных оппонента: фамилия, имя, отчество, дата рождения, отзыв оппонента, комплект документов необходимый для предоставления отзыва, а также на получение денежной компенсации за проезд, проживание в гостинице, работу по оппонированию.

Дата 10.01.2023 (подпись) Л.М. Межевикина (ФИО) Межевикина Л.М.

Подпись заверить по месту работы.



Подпись

Удостоверяю

Межевикина Л.М.

10.01.2023.