

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Макарова Максима Сергеевича на диссертационную работу Сергеевой Екатерины Андреевны на тему «Влияние моделированной микрогравитации на мегакариоцитарные клетки человека *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология

Актуальность работы

Развитие космических технологий неизбежно ставит проблему изучения структурно-функциональной организации живых систем в условиях длительного космического полета. Некоторые из таких условий, в частности, микрогравитация, могут быть смоделированы в рамках исследовательской и научно-практической работы. Клеточные культуры являются очень удобной моделью для оценки физических форм воздействия, позволяют в динамике оценивать пролиферативную, миграционную, секреторную активность клеток, исследовать влияние физических факторов на генотип и фенотип клеток. В работе Екатерины Андреевны Сергеевой предлагается исследовать морфологические, функциональные и молекулярные изменения в мегакариоцитарных клетках человека, обусловленные воздействием микрогравитации *in vitro*. Неоднократно показано, что длительное пребывание в космосе вызывает изменение гемопоэза, нарушает работу клеточного звена гемостаза, усиливает риск развития апоптотических процессов в клетках крови. При этом не проводилось подробного исследования структурно-функциональной организации мегакариоцитов человека в условиях воздействия микрогравитации. Таким образом, выбранная Сергеевой Е.А. тема работы является высоко актуальной.

Новизна полученных результатов, научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Впервые показаны структурно-функциональные и фенотипические изменения, возникающие в мегакариоцитарных клетках человека линии MEG-01 под действием RPM-моделированной микрогравитации. Установлено, что микрогравитация снижает пролиферативную активность клеток MEG-01 через 3-4 суток и их жизнеспособность через 7 суток, повышает риск развития в них апоптотических изменений по митохондриальному пути, вызывает угнетение анти-апоптотического белка Bcl-2. Установлено, что микрогравитация снижает экспрессию белка CD33 на поверхности

клеток MEG-01 и не влияет на экспрессию маркеров CD 13 и CD 19. Показано, что микрогравитация влияет на структуру ядра и цитоскелета мегакариоцитарных и мегакариобластных клеток. Впервые показано, что в условиях *in vitro* микрогравитация нарушает экспрессию циклинов А, В и D в клетках MEG-01 и не влияет на экспрессию циклина Е. Показано, что выраженное снижение жизнеспособности клеток MEG-01 происходит через 7 суток после начала воздействия микрогравитации, при этом на 3-7 сутки с момента воздействия динамика активности циклинов А, В и D является неоднородной.

Научно-практическая значимость полученных результатов

Проведенные Сергеевой Е.А. исследования расширяют представления о влиянии состояния микрогравитации и невесомости на структурно-функциональную организацию клеток костного мозга, на работу кроветворной системы в условиях космического полета, проясняет причины, лежащие в основе нарушений тромбоцитарного звена гемостаза у космонавтов. Изучение структурно-функциональной организации мегакариоцитов и мегакариобластных клеток имеет большое значение для сфер практического здравоохранения, такие как гематология и трансфузиология, клиническая лабораторная диагностика. Полученные данные могут быть использованы в научно-исследовательских работах, моделирующих длительное существование живых систем в условиях космического полета. Полученные данные о морфологических, функциональных, молекулярных изменениях клеток MEG-01 под действием микрогравитации имеют большое значение для фундаментальных разделов клеточной биологии, патоморфологии, патофизиологии. Установка молекулярных механизмов, связанных с нарушением клеточного цикла мегакариоцитарных и мегакариобластных клеток способствует развитию фундаментальных представлений о механизмах регуляции клеточного цикла кроветворных клеток в условиях невесомости и о путях его стабилизации.

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

Диссертация выполнена по классической форме и содержит необходимые разделы, требуемые по стандарту ГОСТ для диссертационных работ. Диссертация представляет собой исследование структурно-функциональной организации мегакариоцитарных клеток MEG-01, испытывающих воздействие микрогравитации *in*

vitro. Работа изложена на 126 страницах и содержит требуемые ВАК разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список литературы, включающий 30 отечественных и 280 зарубежных источника. Диссертация иллюстрирована 2 таблицами и 27 рисунками. Цель и задачи диссертационной работы сформулированы четко. Указана научная и практическая значимость и новизна работы, положения, выносимые на защиту, сформулированы четко, указан личный вклад автора в выполнение работы, отражающий высокий уровень участия диссертанта во всех этапах работы. В разделе «Обзор литературы» подробно приведены современные представления о влиянии невесомости и микрогравитации на клетки человека разных типов, на экспрессию генов клеточного цикла, о возможных нарушениях внутриклеточного сигналинга и развития апоптоза в условиях микрогравитации. Описаны подходы к моделированию условий микрогравитации при работе с культурой клеток человека и культурами клеток животных. Указана необходимость подробного изучения влияния микрогравитации на гемопоэтические клетки, в том числе мегакариоциты. В разделе «Материалы и методы» дается описание методики культивирования мегакариоцитарных клеток MEG-01, моделирования микрогравитации *in vitro*, подробное описание работы по исследованию структуры клеток, их фенотипа, экспрессии маркеров пролиферации, клеточного цикла и апоптоза с использованием световой и флуоресцентной микроскопии, проточной флуориметрии, методов вестерн-блот анализа, методов ПЦР-анализа. Выбранные методы экспериментального исследования и статистической обработки данных являются адекватными. Раздел «Результаты» содержит последовательное изложение научных данных, полученных в процессе исследования. Подразделы главы «Результаты» четко соответствуют поставленным задачам. Необходимо отметить высокое качество фотографий клеток, полученных с помощью окрашивания тремя разными флуоресцентными красителями. Обоснованность и достоверность результатов обусловлена достаточным количеством серий экспериментов и исследований, включающих гистологические, иммуноморфологические, цитометрические, молекулярно-биологические, статистические методы. Выводы отражают основные результаты, полученные в работе.

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации и требованиям п. 25 Положения о присуждении ученых степеней.

По материалам диссертационной работы Е.А. Сергеевой опубликовано 7 научных работ: три статьи в научных изданиях из актуального «Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук», и одна статья в журнале, входящем в международные базы данных, что приравнивается (согласно постановлению Правительства РФ №62 от 24.01.2024) к публикациям в журналах из списка ВАК, и 3 тезисов докладов. Число опубликованных работ является обширным и достаточным для соискания ученой степени кандидата наук.

Замечания к работе

Стиль изложения не всегда соответствует академическим нормам.

Часть материала, приводимого в обзоре литературе, является избыточной, поскольку не затрагивает непосредственно предмет исследования.

При описании методики моделирования микрогравитации *in vitro* не очень понятно, могли ли клетки MEG-01 контрольной группы контактировать с дном культурального флакона при экспозиции в течение 72-168 часов. Это уточнение позволило бы лучше понять эффект воздействия микрогравитации на клеточный цикл.

На рисунке 14 разные фотографии сильно различаются по цветовой гамме фона, что мешает оценить влияние микрогравитации на распределение оксифильных и базофильных красителей в клетках.

При описании локализации α -тубулина в клетках MEG-01 до и после воздействия микрогравитации автор делает заключение о том, что микрогравитация вызывает накопление α -тубулина вокруг клеточных ядер, однако на микроскопических снимках этот эффект не является выраженным. Судя по представленным фотографиям, микрогравитация вызывает перемещение части α -тубулина из центральной части клеток на периферию, что, в свою очередь, может быть связано с изменением работы клеточного центра (области генерации микротрубочек) и может оказывать влияние на митотические процессы.

Автор делает заключение об адаптации клеток MEG-01 к RPM-моделированной микрогравитации на основе оценки выживаемости, пролиферации и экспрессии поверхностных маркеров, однако изначально нигде не указаны точные критерии, позволяющие говорить об адаптации клеток MEG-01 к тем или иным условиям. В связи со снижением жизнеспособности клеток MEG-01 и маркера CD33 через 168 часов и их

пролиферативной активности через 72 и 96 часов возникает вопрос о том, на каком этапе происходит адаптация и в какой степени она выражена.

Закключение об адаптации клеток MEG-01 несколько противоречит данным, полученным в ходе микроскопического исследования клеток и оценки экспрессии про-апоптотических и анти-апоптотических белков. Было бы корректнее указать, что снижение ряда функциональных характеристик клеток MEG-01 под действием микрогравитации *in vitro* не является критическим для их жизнеспособности на уровне всей популяции.

В обсуждении стоило количественно сопоставить собственные данные и данные других авторов, касающиеся степени снижения морфофункциональных параметров клеток в условиях модулированной гравитации. Такой подход позволил бы оценить, насколько серьезным является воздействием микрогравитации на указанные параметры.

В выводах №1 и №2 стоило количественно показать степень снижения выживаемости и пролиферации и маркеров MEG-01 (во сколько раз) на разных сроках воздействия RPM-моделированной микрогравитации. В выводе №4 стоило указать конкретные числовые значения изменения экспрессии про-апоптотических и анти-апоптотических белков. В выводе №5 стоило подчеркнуть, что RPM-моделированная микрогравитация изменяет экспрессию циклинов конкретного типа (А, В и D), затем указать сроки и характер этого изменения.

Высказанные замечания имеют рекомендательный характер, не являются принципиальными и не влияют на общую положительную оценку работы.

Закключение

Диссертация Сергеевой Екатерины Андреевны на тему «Влияние моделированной микрогравитации на мегакариоцитарные клетки человека *in vitro*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология, является самостоятельной законченной научно-квалифицированной работой, в которой решена научная задача – исследование особенности структурно-функциональной организации мегакариоцитарных клеток MEG-01, испытывающих воздействие микрогравитации *in vitro*. Результаты диссертационного исследования имеют большое научно-практическое значение для патофизиологии, патоморфологии, клеточной биологии, гематологии.

По актуальности темы исследования, научному и методическому уровню, теоретической и практической значимости и достоверности полученных результатов

диссертация Сергеевой Екатерины Андреевны соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (пп. № 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. – с последующими редакциями), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Старший научный сотрудник
ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
д.б.н.



Макаров Максим Сергеевич

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В.Склифосовского
Департамента здравоохранения г. Москвы», Адрес: 129090, Москва,
Б. Сухаревская пл., д. 3

Подпись М.С. Макарова заверяю
Ученый Секретарь
ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»,
к.м.н.

21.05.2015



Шахова Ольга Борисовна