

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
«Международный томографический центр»
Сибирского отделения
Российской академии наук

академик

В. И. Овчаренко

“05” декабря 2016 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о диссертационной работе Конова Константина Борисовича «Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны», представленной на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 – физика магнитных явлений

Современные технологии криоконсервации уже сейчас находят широкое применение в медицине и сельском хозяйстве для длительного хранения клеточных культур и ранних эмбрионов. Однако, в настоящий момент не существует подходов, обеспечивающих выживание млекопитающих и птиц. Дальнейшее развитие данных технологий безусловно актуально и ввиду очевидных причин возможно лишь благодаря совместным усилиям ученых из таких областей науки как медицина, биология, химия и физика. Процесс криоконсервации хоть сколько-нибудь больших биологических тканей крайне сложен – необратимые изменения возможны как на молекулярном уровне (криоденатурация белков), так и на субклеточном уровне (образование крупных кристаллов льда в межклеточном пространстве с сопутствующим разрывом множества клеточных мембран). Вещества, призванные сделать процесс криоконсервации успешным, называются криопротекторами. И хотя такие криопротекторы, как полисахариды и глицерин уже сейчас широко используются в практике хранения клеточных культур, их механизмы криозащиты до сих пор являются предметом научных дискуссий. Очевидно, что глубокое понимание данных механизмов необходимо, поскольку может обеспечить прорыв в технологиях криоконсервации. Данные исследования

востребованы в невероятной степени, ведь даже развитие подходов криоконсервации отдельных органов способно кардинально изменить ситуацию в трансплантологии и улучшить качество жизни определенной группы людей.

Как уже было сказано, в процессе криоконсервации биологическая ткань подвергается существенным воздействиям, часть которых может вызывать необратимые губительные последствия. Исследование данных процессов на молекулярном уровне с целью обеспечения сохранности индивидуальной клетки в процессе криоконсервации безусловно необходимо для развития подходов криоконсервации комплексных биологических систем. Разрыв мембраны клетки с последующей потерей части внутриклеточной жидкости и органелл – наиболее распространенное следствие необратимой криоконсервации. Механизмы взаимодействия криопротекторов с клеточной мембраной, обуславливающие защиту мембраны в процессе заморозки клетки, и их эффективность активно изучаются во многих лабораториях мира, ведущих исследование в этой области. Значимость и важность данных исследования, как для фундаментальной, так и для прикладной науки переоценить невозможно. В связи с этим **диссертационная работа К.Б. Конова**, выполненная в лаборатории спиновой физики и спиновой химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского Казанского научного центра Российской академии наук (КФТИ КазНЦ РАН) посвященная изучению механизма криозащитного действия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на модельную клеточную мембрану, **является, без сомнения, актуальной.**

Работа представляет собой логическое продолжение и дополнение систематических исследований свойств модельных клеточных мембран и процессов с ними связанных методами импульсной ЭПР-спектроскопии, проводимых в ИХГК СО РАН.

Диссертационная работа (всего 137 стр.) включает введение, литературный обзор (на 25 стр.), главу с описанием используемых экспериментальных методов (на 20 стр.), четыре главы с полученными результатами и их обсуждением (на 60 стр.), заключение, благодарности, список цитируемой литературы (215 ссылок) и список авторских публикаций по теме диссертации (11 ссылок). Материал диссертации содержит 0 таблиц, 36 рисунков и 91 формулу.

Литературный обзор состоит из семи разделов, обобщающих данные по (i) роли воды в поддержании структуры биологических систем, (ii) различным факторам повреждения биологических клеток при замораживании, (iii) механизмам действия криопротекторов, (iv) структурам биомембран, (v) фазовым состояниям липидных мембран, (vi) особенностям подвижности

молекул в неупорядоченных средах и (vii) исследованиям подвижности липидных мембран. Показана актуальность исследования криопротекторов.

Таким образом, литературный обзор соответствует теме диссертационной работы, свидетельствует о профессиональной компетентности Конова К.Б. в данной области и дает наглядное представление о современном уровне рассматриваемых проблем. Очевидно, что обзор литературы позволил автору определить наиболее актуальное направление развития собственных исследований, сформулировать цели и задачи работы, оценить полученные результаты на фоне общего состояния проблемы. Следует добавить, что приведенные в обзоре литературные данные рассмотрены критически и подробно обсуждены.

При проведении собственных исследований по теме диссертации автору удалось получить данные о профиле проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны, изучить взаимодействие молекул сахарозы и трегалозы с модельной липидной мембраной и исследовать влияние глицерина, трегалозы, сахарозы и сорбита на подвижность модельной липидной мембраны.

В результате изучения профиля проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны было установлено, что амплитуда модуляций спинового эха для образцов, гидратированных водно-глицериновой смесью, слабо отличается от амплитуды для образцов, гидратированных водой, для всех положений спиновой метки, кроме 16 положения, для которого амплитуда в случае гидратации водой близка к нулю, а в случае гидратации водно-глицериновой смесью существенно выше нуля. Это по мнению автора свидетельствует о том, что глицерин свободно диффундирует сквозь липидную мембрану, в то время как молекулы воды не доходят до центра мембраны. Полученные данные согласуются с имеющейся в литературе гипотезой диффузионного прохождения глицерина сквозь липидную мембрану.

Результаты исследования автором взаимодействия молекул сахарозы и трегалозы с модельной липидной мембраной подтверждают имеющуюся в литературе гипотезу вытеснения воды данными криопротекторами. Было установлено, что адсорбция молекул дисахаридов на модельной мембране хорошо описывается в рамках модели Ленгмюра. Получены профили проникновения сахарозы и трегалозы внутрь модельной клеточной мембраны. Обнаружена высокая концентрация молекул дисахаридов внутри модельной мембраны.

При исследовании подвижности модельной липидной мембраны было установлено, что подвижность поверхностного слоя мембраны в случае гидратации водой и водно-глицериновым раствором полностью определяется подвижностью окружающей мембрану сольватной оболочки, в то время как подвижность внутренних слоев мембраны от сольватной оболочки зависит заметно слабее. Также было показано, что присутствие глицерина увеличивает

подвижность поверхностного слоя, при этом не сдвигая температуру динамического перехода. Увеличение подвижности в присутствии глицерина по мнению автора можно объяснить либо стеклованием сольватной оболочки, либо тем, что глицерин вблизи поверхности бислоя встраивается между молекулами липидов, увеличивая площадь, приходящуюся на одну молекулу липида. К.Б. Конова подчеркивает, что подтверждение этой гипотезы требует проведения дополнительных исследований.

Выполненные исследования влияния трегалозы, сахарозы и сорбита на подвижность модельной липидной мембраны позволили установить, что в присутствии сахарозы и трегалозы подвижность фосфолипидов мембраны сохраняется вплоть до температуры 130 К, в то время как при гидратации чистой водой подвижность отсутствует уже при температуре 160 К. Данное наблюдение может служить доказательством существования прямого взаимодействия между молекулами дисахаридов и липидов. Особо отмечено, что, для образцов, гидратированных водным раствором сорбита, подобного эффекта пронаблюдать не удалось.

Результаты, полученные диссертантом и представленные в четырех главах диссертации, имеют существенное значение для понимания механизмов защитного действия криопротекторов на модельную клеточную мембрану, демонстрируют **беспорную научную новизну и оригинальность**.

Несомненную практическую значимость представляют полученные автором профили проникновения в модельную клеточную мембрану глицерина, сахарозы и трегалозы. В случае сахарозы и трегалозы характер их взаимодействия с модельной липидной мембраной подтверждает имеющуюся в литературе гипотезу вытеснения воды данными криопротекторами. Было установлено, что адсорбция молекул дисахаридов на модельной мембране хорошо описывается в рамках модели Ленгмюра. Обнаружена высокая концентрация молекул дисахаридов внутри модельной мембраны.

Обоснованность, достоверность и новизна полученных в работе результатов и сделанных выводов базируется на скрупулезно и грамотно проанализированных экспериментальных данных, полученных как стационарными, так и импульсными методами ЭПР-спектроскопии, а потому не вызывают сомнений. Полученные в данной работе знания, безусловно, внесут достойный вклад в развитие научных основ криобиологии и криомедицины и могут быть использованы для создания новых технологий криосохранения и криозащиты органических тканей и клеток.

Очевидно, что автором проделана сложная аналитическая работа, потребовавшая **высокой квалификации**, глубокой предварительной теоретической и практической проработки, знания современных экспериментальных методов ЭПР-спектроскопии.

Рецензируемая работа не имеет существенных недостатков, которые могли бы препятствовать ее успешной защите, однако в присланном экземпляре диссертационной работы обнаружены недостатки, связанные с оформлением, а также ряд мелких стилистических замечаний.

- в литературном обзоре отсутствует какой-либо иллюстрирующий материал. Его наличие могло бы в сильной степени облегчить понимание написанного. Так; например, при описании фазовых состояний липидных мембран читателю приходится в уме вырисовывать строение ламеллярной жидкокристаллической фазы, гелевой рифленой фазы, гелевой фазы и суб-гелевой фазы.

- диссертация посвящена изучению воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны. В тексте диссертации имеется рисунок с изображением структур дисахаридов, но изображения структуры глицерина и сорбита отсутствуют. Вероятно, читателю предлагается их либо знать, либо найти самостоятельно в сторонних источниках;

- по тексту можно встретить различное написание слова «ламеллярное»;

- «гамильтониан» и «зеемановское» пишутся в тексте как с заглавной, так и со строчной буквы;

- при изучении профиля проникновения воды и глицерина внутрь модельной мембраны была проведена калибровка интенсивности соответствующей амплитуды огибающей сигнала электронного спинового эха в зависимости от концентрации дейтерированного глицерина в водноглицериновом растворе (рис. 3.7). Используемые при калибровке концентрации лежат в интервале 8-14 моль/литр, а зарегистрированные концентрации в модельной мембране (рис. 3.11) – в совершенно другом интервале: 0-4 моль/литр. Не может ли калибровка, выполненная в несоответствующих концентрациях, негативным образом сказаться на точности проводимых экспериментов?

- в подписях к рисункам 4.7 и 4.8 указано «Спин-меченный фосфолипид ОПФХ отмечен как $p=0$ », но на самом деле эти данные на рисунках отсутствуют;

- на стр. 91, строка 5 вместо ссылки на рисунок 3.8 должна быть ссылка на рисунок 3.9;

- по прочтении главы 6 читателю остается неясным, почему вместо спин-меченного фосфолипида использовались спин-меченные стеариновые кислоты;

- найдены опечатки (стр. 6, строка 2; стр. 15, строка 4 снизу; стр. 17, строка 9 снизу; стр. 18, строка 7 снизу; стр. 28, строка 9 снизу; стр. 35, строка 7 снизу; стр. 42, строка 5 снизу; подпись к рисунку 4.11);

Сделанные замечания не являются принципиальными, не снижают ценности выполненного научного исследования и не уменьшают общего благоприятного впечатления. В целом диссертационная работа Конова К.Б. является логически завершенной научно-квалификационной работой, в которой сделан существенный вклад в понимание механизма действия некоторых криопротекторов. В частности, были получены новые экспериментальные данные, подтверждающие гипотезу вытеснения воды. Подтверждение гипотезы вытеснения воды дает лучшее понимание процессов, происходящих при замораживании клеток в присутствии криопротекторов. Это понимание необходимо для создания эффективных криозащитных растворов и развития криозащитных технологий в целом.

Основные результаты работы в полной степени отражены в научной печати. По теме диссертации опубликовано четыре статьи в авторитетных в данной области журналах (*Molecular Physics, Appl. Magn. Reson., J. Phys. Chem. B.*), входящих в перечень, рекомендованный ВАК. Результаты работы были широко представлены на всероссийских и международных конференциях (тезисы 7-ми докладов).

Автореферат диссертации соответствует основным положениям диссертации, ее содержанию, выдержан по форме и объему.

Диссертационная работа Конова К.Б. представляет интерес для широкого круга специалистов, занимающихся фундаментальными вопросами криобиологии и криомедицины, а также в области электронного парамагнитного резонанса.

Результаты работы могут быть использованы в организациях, работающих в области спектроскопии электронного парамагнитного резонанса, в частности, в практике лабораторий МГУ им. М.В. Ломоносова, Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Международного томографического центра СО РАН, Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УНЦ РАН, НИИ РЕАКТИВ МО РФ, Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Института неорганической химии им. А.В. Николаева и др.

На основании вышеизложенного можно заключить, что рецензируемая диссертационная работа «Исследование методами ЭПР воздействия криопротекторов сахарозы, трегалозы, глицерина и сорбита на структуру и динамику модельной липидной мембраны» по актуальности темы, научной новизне, практической значимости полученных результатов, обоснованности

сделанных выводов и уровню исполнения является логически законченным исследованием, соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе п. 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 и другим требованиям ВАК. Автор работы, Константин Борисович Конов, заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 – физика магнитных явлений.

Отзыв на диссертационную работу К.Б. Конова обсужден и утвержден на заседании Ученого совета МТЦ СО РАН (протокол № 11 от 14 октября 2016 г).

Кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории магнитного резонанса
ФГБУН МТЦ СО РАН

 С.Л. Вебер

Почтовый адрес:
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3А,
ФГБУН МТЦ СО РАН
Рабочий телефон: +7 (383) 3307547
Сотовый телефон 89137340085
e-mail: Sergey.Veber@tomo.nsc.ru

