

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Макашової Олени Євгенівни «**Вплив антиоксидантів на стан ядровмісних клітин кордової крові під час кріоконсервування з кріопротектором диметилсульфоксидом**», поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю **03.00.19 – кріобіологія**

Актуальність обраної теми.

Дисертаційна робота Макашової О.Є. присвячена актуальній науковій проблемі, а саме, поглибленню знань про кріоконсервування ядровмісних клітин (ЯВК) кордової крові (КК) та впливу різних антиоксидантів на структурно-функціональний стан ядровмісних, у тому числі гемопоетичних прогеніторних (ГПК), клітин КК на всіх етапах технологічного процесу кріоконсервування, а також після перенесення до умов, наближених до фізіологічних. Саме вивчення поєднаного застосування кріопротектору ДМСО та антиоксидантів на структурно-функціональний стан ЯВК КК становить значну новизну отриманих результатів та за умов їх подальшого вивчення можуть бути використані у практичній медицині. Також у роботі підіймаються загальнобіологічні питання, спрямовані на вивчення модифікацій структурного стану та розвитку окисних процесів в ЯВК КК людини, у тому числі ГПК, під впливом кріозахисних розчинів ДМСО та антиоксидантів, а також дослідження шляхів розвитку апоптозу і можливості його запобігання для підвищення стійкості клітин на етапах кріоконсервування та після перенесення до умов, що моделюють фізіологічні.

Саме тому дисертацію Макашової О. Є. слід вважати актуальною і необхідною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконана у відділі кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у рамках науково-дослідних тем: № 47: «Вивчення механізмів структурно-функціональних змін ядровмісних клітин кордової крові

і еритроцитів під впливом екзо- і ендоцелюлярних кріопротекторів та низьких температур» (шифр – 2.2.6.47, № державної реєстрації 0109U00278); № 90: «Вивчення механізмів модифікації структурних параметрів та метаболічного стану ядровмісних клітин кордової та еритроцитів донорської крові під впливом різних кріозахисних розчинів та низьких температур»(шифр – 2.2.6.90, № державної реєстрації 0114U001320).

Структура, обсяг і зміст дисертації. Дисертаційна робота викладена на 240 сторінках, 43 з яких займає список використаної літератури, що включає 352 найменування. Робота побудована за класичним зразком і складається з анотації, вступу, огляду літератури, відомостей про матеріали і методи, трьох розділів власних досліджень, їхнього узагальнення, висновків та двох додатків. Дисертація добре проілюстрована, містить 46 рисунків і 21 таблицю.

У вступі обґрунтована актуальність роботи, вказаний зв'язок з науковими програмами, сформульовані мета, завдання, об'єкт і предмет дослідження, визначені наукова новизна і практичне значення, а також надані відомості про особистий внесок здобувача та апробацію матеріалів дисертації. Таким чином, розділ містить всі необхідні пункти.

Глава «Огляд літератури» побудована логічно, складається з п'яти підрозділів і повністю висвітлює площину наукових досліджень, в якій лежить робота здобувача. Детально проаналізовані загальнобіологічні і специфічні властивості ГПК КК, розглянуті сучасні підходи щодо їхнього кріоконсервування, а також методи оцінки їхнього структурно-функціонального стану. У даній главі велика увага приділяється видам клітинної загибелі кріоконсервованих ЯВК КК і ролі активних форм кисню (АФК) в їх розвитку та ролі антиоксидантної системи в запобіганні накопиченню АФК.

Розділ «Матеріали і методи» містить відомості про використані в роботі методичні підходи, відповідність яких завданням роботи не викликає сумнівів і

зауважень. Слід особливо підкреслити, що робота виконана на сучасному обладнанні, докладний перелік якого наведено у розділі.

Результати власних досліджень викладені в трьох розділах, перший з яких присвячений оцінці збереженості, життєздатності та кількості ЯВК, у тому числі ГПК, КК з надлишковим вмістом АФК до та після кріоконсервування з ДМСО та антиоксидантами. У підрозділі 3.1 наводиться детальний опис та відпрацювання методичного підходу для оцінки кількості клітин із надлишковим вмістом АФК за допомогою флуоресцентного барвника дихлородигідрофлуоресцеїн діацетату ($\text{DCFH}_2\text{-DA}$). Автором була визначена оптимальна концентрація даного барвнику для оцінки кількості ядровмісних клітин кордової крові з надлишковим вмістом АФК— 5мкМ. Приготування розчину $\text{DCFH}_2\text{-DA}$ *ex tempore* не є необхідним при проведенні кожного наступного експерименту. Відмивання клітинної суспензії від флуоресцентного барвника $\text{DCFH}_2\text{-DA}$ шляхом додавання фізіологічного розчину, приготовленого на фосфатному буфері є обов'язковим кроком.

Автором була показана зворотна залежність між числом збережених клітин і кількістю DCF^+ -клітин: при збільшенні рівня АФК в клітинах та впливу факторів кріоконсервування, відбувається зниження кількості збережених ЯВК КК після кріоконсервування. Автор робить дуже важливе припущення: «зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги є одним із перших неспецифічних ланок у розвитку стрес-реакції клітини на додавання ДМСО і може служити медіатором підвищеного рівня АФК, що ініціює апоптоз і в подальшому призведе до загибелі клітин після кріоконсервування». Цікавими та новими є результати, викладені в підрозділах 3.2-3.4, які присвячені впливу антиоксидантів на стан ЯВК до та після кріоконсервування з ДМСО в різних концентраціях. У ході проведених досліджень автор з'ясував, що додавання до кріозахисного середовища антиоксидантів сприяло зменшенню кількості DCF^+ -клітин і попереджало розвиток окисного стресу в ЯВК КК під час кріоконсервування та збільшенню їх збереженості та життєздатності. Найбільш

ефективними виявились кріопротекторні розчини, що містять глутатіон у концентрації 1 та 3 мМ та 7,5-10% ДМСО. У цих розчинах можливо зберегти до 77% ЯВК та 85% CD34⁺-клітин у життєздатному стані після кріоконсервування.

Найбільший інтерес, на мою думку, становить четвертий розділ роботи, в якому проведений аналіз впливу різних концентрацій ДМСО та антиоксидантів на стан деконсервованих ЯВК КК після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні. Автор обґрунтовує важливість перенесення ЯВК КК до умов, які моделюють фізіологічні, для визначення терапевтичної ефективності препаратів КК. Треба зазначити, що вибрана дисертантом модель умов, які моделюють фізіологічні, забезпечує контроль основних параметрів середовища для оцінки стабільності кріоконсервованих ЯВК. Автором було показано, що під час перенесення клітин в умови, які моделюють фізіологічні, відбувається зниження збереженості та життєздатності ЯВК, у тому числі ГПК, КК. Однією з причин цього є накопичення АФК під час впливу фізико-хімічних стрес-факторів кріоконсервування. Автор приходить до висновку, що стан клітин, визначений одразу після розморожування не може дати повну оцінку якості препаратів КК. Тому визначення відстроченого виживання клітин має практичну та наукову цінність. Автор наголошує на тому, що кріоконсервування ЯВК з додаванням АК в ефективних концентраціях (0,1 та 0,15 мМ) та подальше перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, продемонструвало значуще підвищення як загальної кількості збережених клітин, так і числа життєздатних. Проте збільшення кількості клітин із надлишковим вмістом АФК свідчить про подальший розвиток окисного стресу в клітинах, який призведе до додаткової втрати клітин. На підставі отриманих результатів автор робить висновок, що АК має тимчасову антиоксидантну дію та не здатна ефективно попереджати надмірне накопичення АФК в ЯВК КК після перенесення їх до фізіологічних умов. Автор також наголошує на тому, що кріоконсервування ЯВК КК в розчинах, які містять аскорбінову кислоту, є перспективним напрямком для розробки протоколів кріоконсервування, проте

слід враховувати, що дана сполука може виступати в ролі як потужного антиоксиданту, так і мати виражений прооксидантний вплив, тому її концентрація має бути ретельно підібрана.

У ході проведених експериментальних досліджень автор показав, що глутатіон та АЦ забезпечували виражене зниження кількості клітин із надлишковим вмістом АФК та значуще підвищення збереженості та життєздатності. Найбільший цитопротекторний ефект мав глутатіон. Було також визначено, що кріоконсервування CD34⁺-клітин в розчинах, які містять 5% ДМСО та ефективні концентрації даного антиоксиданту (1 та 3 мМ) перевищували дані зі загальноновживаними концентраціями ДМСО (7,5 і 10%) без застосування антиоксидантів. Отримані автором в результаті експериментальних досліджень результати можуть стати передумовою до вдосконалення існуючих методів кріоконсервування ЯВК КК, за рахунок запобігання розвитку апоптозу і, як наслідок, загибелі клітин, як на етапі підготовки до кріоконсервування, так і після заморожування-відігрівання.

Остання глава результатів власних досліджень присвячена проблемі оцінки стадій апоптозу/некрозу ЯВК КК після кріоконсервування в розчинах із різною концентрацією ДМСО та антиоксидантів і перенесення до умов, які моделюють фізіологічні. Автором було проведено порівняльне вивчення кількості ЯВК КК, які перебувають на різних стадіях апоптозу/некрозу без додавання антиоксидантів до кріозахисного середовища з ДМСО та з застосуванням антиоксидантів. Представлені у даному розділі результати свідчать про те, що використання антиоксидантів здатне підвищити кількість живих неушкоджених клітин (AnnexinV⁺/7AAD⁻) на відміну від застосування кріозахисного середовища тільки з одним кріопротектором. Порівнюючи вплив антиоксидантів, які вивчалися, на кількість AnnexinV⁺/7AAD⁻-клітин після кріоконсервування, автор зазначає, що найбільша кількість неушкоджених клітин отримана при додаванні АЦ та глутатіону в ефективних концентраціях до 7,5% ДМСО. Було встановлено, що

перенесення клітин до умов, які моделюють фізіологічні, призводило до вираженої втрати кількості AnnexinV⁺/7AAD⁺-клітин, порівняно з даними, отриманими одразу після розморожування. Додавання до кріозахисного середовища, що містить 7,5% ДМСО антиоксидантів підвищувало ці показники.

Роботу завершує узагальнення отриманих результатів і сформульовані відповідні висновки.

Обґрунтованість і достовірність висновків і основних положень дисертації забезпечені тим, що експериментальні дані були отримані за допомогою широкого спектру сучасних методів дослідження: світлова мікроскопія; проточна цитофлуориметрія з використанням флуоресцентномічених моноклональних антитіл (CD45 FITC/CD34 PE, CD45 PE) та барвників (7AAD, Annexin V FITC, DCFH₂-DA); виділення ядровмісних клітин кордової крові за допомогою поліглюкіну; кріоконсервування. Все це дозволило коректно і адекватно вирішити всі поставлені дисертантом завдання.

Зроблені автором висновки логічно випливають із наведених результатів, які ретельно проаналізовані з використанням адекватних методів статистичної обробки. Вищезазначене свідчить про цільність і завершеність роботи.

Наукова новизна роботи.

У роботі вперше встановлено, що внесення ефективних концентрацій АЦ та глутатіону до зразків із різним вмістом ДМСО на етапі обробки кріопротектором сприяє зменшенню негативного впливу факторів кріоконсервування на ЯВК КК, у тому числі ГПК, що виражається в зниженні кількості клітин із надлишковим вмістом АФК і, відповідно, підвищенні їх збереженості та життєздатності після розморожування та, особливо, після перенесення до умов, які моделюють фізіологічні. При вивченні стадій апоптозу/некрозу ЯВК КК вперше встановлено, що додавання АО в ефективних

концентраціях дозволяє зберігати більшу кількість неушкоджених ЯВК після розморожування та при їх перенесенні до умов, які моделюють фізіологічні, порівняно зі зразками, кріоконсервованими без додавання АО. При цьому найбільш виражений ефект спостерігається в зразках, кріоконсервованих із глутатіоном. Новими є результати про використання АО в ефективних концентраціях під час кріоконсервування ЯВК КК, у тому числі ГПК, дозволяє знизити ефективну концентрацію ДМСО до 5%, що забезпечує зменшення токсичного ефекту на клітини, та при цьому отримати збереженість та життєздатність на рівні зразків, кріоконсервованих з 7,5 та 10% ДМСО без застосування АО.

Практичне значення одержаних результатів і рекомендації щодо їх використання. У дисертаційній роботі проведене комплексне вивчення стану ЯВК КК, у тому числі ГПК, що дозволило розробити метод кріоконсервування даних клітин із додаванням до кріозахисного середовища антиоксидантів, який забезпечує підвищення збереженості та життєздатності клітин КК після розморожування та, особливо, після перенесення до умов, наближених до фізіологічних. Отримані результати досліджень мають велике науково-практичне значення в аспекті створення запасів ЯВК КК, у тому числі ГПК, для довгострокового зберігання з метою подальшого клінічного застосування. Результати роботи можуть бути рекомендовані для розробки нових і вдосконалення існуючих технологій кріоконсервування клітинних суспензій, а також – у навчальному процесі.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 30 наукових праць, серед них 6 статей у наукових фахових виданнях України (1 – входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus), 5 – у зарубіжних збірниках матеріалів конференцій (1 – входить до міжнародної наукометричної бази даних

Scopus), 1 – у збірнику наукової конференції України, 1 – патент на корисну модель та 17 тез. Матеріали роботи доповідалися та обговорювалися на багатьох наукових з'їздах і конференціях. Наукові праці повною мірою відображають всі розділи дисертації і автореферату.

При аналізі дисертаційної роботи виникли певні запитання та зауваження, а саме:

1. Цікаво було б дізнатися чи можливе перенесення отриманих результатів на інші біологічні об'єкти, кріоконсервування яких потребує використання інших кріопротекторів?

2. У 4-му розділі результатів власних досліджень наводяться результати, отримані після годинної інкубації деконсервованих клітин у розчині Хенкса. Чи проводилась Вами трансфузія більш тривалий час, або чи плануєте Ви це робити у своїх подальших дослідженнях?

3. Зважаючи на те, що одним із показників функціональної активності клітин є їх здатність до утворення колоній, то цікаво було б вивчити здатність кріоконсервованих в різних розчинах клітин кордової крові до колонієутворення.

4. В тексті дисертації зустрічаються незначні помилки і невдалі вирази, на яких я не зупиняюсь.

Ці недоліки не мають принципового значення і не знижують високої наукової і практичної цінності роботи.

Висновок. Дисертаційна робота Макашової Олени Євгенівни «Вплив антиоксидантів на стан ядровмісних клітин кордової крові під час кріоконсервування з кріопротектором диметилсульфоксидом» є самостійною завершеною науковою працею, в якій сформульовані та обґрунтовані положення та висновки, які вирішують наукове завдання спрямоване на комплексне вивчення стану ядровмісних, у тому числі гемопоетичних

прогеніторних, клітин кордової крові, до та після кріоконсервування з проникаючим кріопротектором ДМСО та антиоксидантами, і перенесення до умов, які моделюють фізіологічні, а також визначення процесів, які відбуваються в клітинах під впливом ДМСО, антиоксидантів та низьких температур. Автором розроблені умови для підвищення збереженості та довгострокової життєздатності ядровмісних клітин, у тому числі гемопоетичних прогеніторних, після розморожування.

За актуальністю, новизною, об'ємом досліджень, ступенем обґрунтованості наукових положень, висновків, а також практичній та фундаментальній значимості дисертаційна робота відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 року, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 — кріобіологія.

Завідувачка лабораторії фармакології ДУ
 “Інститут проблем ендокринної патології
 ім. В.Я. Данилевського НАМН України”,
 доктор біологічних наук, професор



Н. Г. Малова

