

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Юрчук Таїсії Олександрівни
«Вплив факторів кріоконсервування на морфофункціональні властивості
клітин кори наднирникових залоз щурів», яку представлено на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 -
кріобіологія

Актуальність теми. Актуальність теми визначається необхідністю збереження гормонпродукуючого біоматеріалу у функціонально повноцінному стані для застосування у різних сферах біотехнології та медицини. Дослідження на суспензії клітин кори наднирникових залоз дозволяє вивчати зміни у регуляції їх стероїдогенної активності, що має суттєве значення при оцінці збереження специфічної функції в умовах кріоконсервації. Для розробки підходів, що зменшують вплив факторів ушкодження або запобігають їх дії розуміння механізмів порушень стероїдогенної функції клітин кори наднирникових залоз при кріоконсервуванні має принципове значення. З огляду на малочисельні відомості в даній області, дослідження цього питання має безперечну важливість.

Комплексна оцінка морфофункціонального стану клітин дозволяє найбільш об'єктивно охарактеризувати вплив умов та окремих факторів на функціональну здатність клітин на різних етапах кріоконсервації. Зважаючи на складний та динамічний характер регуляції гормонопоезу комплексний підхід, що було використано в роботі, із застосуванням ряду сучасних високочутливих методів є найбільш адекватним у визначенні змін стану гормонпродукуючих клітин.

Робота виконана в рамках науково-дослідних тем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України відділу кріобіохімії та фармакології нейрогуморальних систем «Властивості ендокринних тканин в умовах кріоконсервування та трансплантації експериментальним тваринам»

(державний реєстраційний номер 0106U002163) і «Дослідження механізмів кріоконсервованих органних культур ендокринних тканин» (державний реєстраційний номер 0101U003478).

Враховуючи вище сказане, дисертаційна робота Юрчук Таїсії Олександрівни, яка присвячена визначенню оптимальних умов та окремих факторів, що сприяють збереженню функціональної здатності клітин кори надниркових залоз щурів при кріоконсервації є необхідною, своєчасною і актуальною.

Структура, обсяг і зміст дисертації. Дисертація побудована за класичним зразком і складається з вступу, огляду літератури, розділів, в яких подаються відомості про матеріал і методи дослідження, результатів цих досліджень, їх узагальнення та обговорення, висновків. Список використаної в роботі літератури становить 189 найменувань. Робота викладена на 146 сторінках друкованого тексту, містить 29 рисунка, проілюстрована 6 мікрофотографіями та 3 таблицями.

У вступі містяться всі необхідні дані щодо загальної характеристики дисертації – її актуальність, мета, завдання дослідження, наукова новизна і практичне значення роботи.

Огляд літератури (Розділ 1) містить детальне викладення відомостей про регулювання гормонпродукції в клітинах кори надниркових залоз, особливості кріоконсервування суспензії клітин ендокринних тканин і застосування флуоресцентних методів для оцінки активності клітин. В цілому викладений матеріал свідчить на користь того, що автор володіє знаннями в області досліджуваної проблеми.

Розділ “Матеріали і методи” написано докладно і конкретно. Розділ включає опис методів, апаратури і реактивів, використаних в роботі. Застосовано методи культуральні, кріоконсервування, радіоімунологічний, волюмометричний та гістохімічний методи, світлова, флуоресцентна та FRET мікроскопії, метод проточної цитофлуориметрії, статистичний аналіз. В цілому

обрані автором методи не викликають особливих зауважень і є адекватними для вирішення поставлених завдань

У розділі 3 наведено результати власних досліджень змін морфофункціональних властивостей суспензії клітин кори наднирників щурів в залежності від умов та дії окремих факторів консервування. Представлені результати і їх обговорення викладені в 5-ти підрозділах.

Перший підрозділ присвячено вивченню впливу етапу інкубації в кріозахисних середовищах на основі ДМСО на зміни обсягу ККН в залежності від присутності в них ФС. Встановлено, що найбільша ступінь дегідратації в клітинах кори надниркових залоз відзначалася в середовищі з концентрацією ДМСО 15% за відсутності ФС. Крім того, при використанні даної концентрації ДМСО спостерігалися виражені зміни властивостей їх клітинної мембрани. Експозиція ККН з кріозахисним середовищем з ДМСО та ФС приводила до зниження ступеню дегідратації клітин. Автором також встановлено, що використання рівних концентрацій ФС в кріозахисному і відмивальному середовищах дозволяє знизити об'ємні зміни клітин.

Наступний підрозділ представляє результати вивчення стану суспензії ККН на етапі еквілібрації в середовищі заморожування. Сукупність застосованих методів включала традиційні методи визначення кількості та збереження клітинних елементів, життєздатності клітин за вилученням трипаного синього, активності клітинних дегідрогеназ за МГТ-тестом. Крім того, вивчався мембранний потенціал мітохондрій за допомогою зонда JC-1, виявляли наявність клітин, що містять ключовий фермент стероїдогенезу 3-бета-ГСД, оцінювали рівень базальної та стимульованої секреції альдостерону. В результаті проведених досліджень показано, що наявність 25% ФС в кріозахисному середовищі з ДМСО сприяє нейтралізації негативного впливу кріопротектора на вивчені функціональні характеристики ККН.

У 3-му підрозділі наводяться дані дослідження функціональних характеристик ККН після кріоконсервування. Автор порівнюючи між собою показники стимульованого і базального синтезу альдостерону в середовищах з

ДМСО в присутності ФС і без неї, зазначив кілька криозахисних середовищ, де досліджені показники були порівнянні з контрольними значеннями. Це середовища з 10% і 15% ДМСО, що містять 25% ФС. У цьому випадку, не дивлячись на збільшення базальної секреції, клітини відповідали на дію стимулятора гормонопоезу, що підтверджує збереження гормон-рецепторного апарату і активність внутрішньоклітинних посередників, що беруть участь в процесі стероидогенезу. З усіх інших досліджуваних показників присутність сироватки при концентраціях ДМСО 7%, 10% і 15% позитивно впливало на функціональний стан криоконсервованих клітин як після відігрівання, так і в процесі короткострокового культивування. Висновки відображають результати роботи і відповідають поставленим завданням.

У наступному підрозділі автор змоделивав дію одного з факторів криоконсервування - гіперосмотичного тиску на зміну об'єму ККН та об'єму, що займають ліпідні краплі. При дії гіперосмотичних розчинів хлориду натрію на ККН встановлений факт запізнювання відновлення об'єму, що займають ЛК, по відношенню до відновлення клітинного об'єму при регідратації з розчинів 0,75 і 1М хлориду натрію. Автор припускає, що таке просторове зближення ЛК при дегідратації і уповільнене відновлення до їх початкового об'єму при регідратації, може призводити до неспецифічної активації базальної секреції гормонів за рахунок наближення субстрату до місця синтезу стероїдних гормонів - мітохондрій. На що вказується також в роботах інших авторів, які використовували подібні моделі.

У зв'язку з цим в наступному підрозділі було вивчено взаємодію ліпідних крапель і мітохондрій, забарвлених нільським червоним і мітотреккергрін відповідно при дії розчину хлориду натрію з використанням FRET – мікроскопії. Показано збільшення ефективності FRET між досліджуваними флюорофорами до рівня 33,7%, що відповідає відстані 60 Å. Таким чином, зміна даного показника внаслідок зближення мічених органел на відстань, що відповідає розміру подвійного фосfolіпідного біслоя мембрани, дає передумови для здійснення активного стероїдогенезу в клітині.

Таким чином результати, що стосуються візуалізації внутрішньоклітинних структур і їх зближення при дегідратації-регідратації у взаємозв'язку з викладеними даними структурно-функціональних особливостей ККН на етапах кріоконсервування, пояснюють один з можливих механізмів збільшення стероїдогенезу на тлі зниження життєздатності при кріоконсервуванні.

Із загальних зауважень до всієї роботи основними є наступні: на мій погляд автору слід було б приділити більше уваги обговоренню механізму захисного впливу ФС, в якому стабілізація об'ємно-структурних характеристик складає частину, але не вичерпує всього спектру регуляторної дії ФС, як компонента кріозахисного та відмивального середовища.

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій дисертації. Зроблене в літературному огляді направлене відображення й узагальнення автором літературних даних дозволяє добре висвітлити ще не вирішені проблеми, чітко сформулювати мету та задачі дисертаційного дослідження, що й зроблено в резюме до огляду.

Планування дослідів, послідовність експериментальних досліджень, методи, що використані, цілком адекватні вирішенню поставлених задач. Для вирішення поставлених у роботі завдань автором було використано комплексний підхід із залученням широкого спектру традиційних та новітніх методів, застосовано сучасне експериментальне обладнання для проведення люмінесцентного аналізу клітин. Зроблені автором висновки логічно випливають з наведених результатів. Все це свідчить про тривку обґрунтованість наукових положень, висунутих дисертанткою і дозволяють вважати, що робота, яку вона виконала, є доцільною.

Достовірність одержаних результатів та їх новизна. Достовірність одержаних результатів обумовлюється розумно вибраними сучасними методами кріобіології, клітинної біології та люмінесцентного аналізу,

адекватними методами статистичної обробки отриманих результатів, їх логічного аналізу і зважених висновків.

Новизна одержаних результатів полягає, перш за все, у тому, за допомогою комплексної оцінки впливу факторів кріоконсервування на морфофункціональний стан первинної суспензії ККН надано теоретичне обґрунтування доцільності включення 25 % ФС до складу кріозахисного середовища, що містить ДМСО, а також у середовище видалення кріопротектора після кріоконсервування ККН.

Показано, що присутність 25 % ФС у кріозахисних середовищах на основі ДМЕМ і ДМСО призводить до зменшення змін відносного об'єму ККН в ході інкубації з цими середовищами. Що може діяти як один з механізмів захисного впливу ФС.

Вперше, на моделі індукованих об'ємно-структурних змін у клітинах доведено, що ці процеси обумовлюють зміни стероїдогенної активності клітин при кріоконсервації і можуть бути нормалізовані за умов введення ФС в якості захисного фактора в середовище заморожування.

Повнота викладу отриманих результатів у публікаціях. Результати наведених в дисертації досліджень повністю відображені в 14 наукових роботах: 6 статей у спеціалізованих наукових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 стаття у зарубіжному виданні, 7 тез доповідей у збірниках наукових робіт науково-практичних конференцій та з'їздів.

Практичне значення отриманих результатів і рекомендації щодо їх використання. Розвинуті у дисертаційній роботі підходи дозволили фактично сформулювати протокол кріоконсервування первинної суспензії ККН щурів. Що є необхідним для наукових і практичних цілей.

Запропоновано використання методик флуоресцентної мікроскопії для оцінки стероїдогенного потенціалу ККН та дослідження механізму збільшення стероїдогенезі на моделі індукованих структурно-об'ємних перебудов клітин.

Зауваження та запитання.

1. Якщо ви акцентуєте увагу на важливості збереження структурно - об'ємних характеристик клітин при кріоконсервації, як механізму функціональної збереженості клітин, чи існує можливість за допомогою зовнішніх кріопротекторів, що стабілізують об'ємно - структурні показники досягти ефектів збереження функціональної активності клітин у тому ж ступені, що і при додаванні ФС?
2. Чи можливо використання ФС у більш низьких концентраціях, або застосування штучних замінників сироватки?
3. Природно, що в тексті дисертації є і помилки, і невдалі вирази, на яких я не зупиняюсь. Ці, та інші недоліки, що є в тексті дисертації, не мають, однак, принципового значення і не знижують високої наукової і практичної цінності роботи.

Загальний висновок полягає в тому, що за актуальністю, високим методичним рівнем, обсягом досліджень, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів, їх вірогідністю, обґрунтованістю висновків, дисертаційна робота Юрчук Таїсії Олександрівни «Вплив факторів кріоконсервування на морфофункціональні властивості клітин кори наднирникових залоз щурів» що представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, повністю відповідає вимогам ДАК України щодо кандидатських дисертацій (п.11 «Порядку

присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 07.03.2007 № 423. стосовно кандидатських дисертацій за спеціальністю 03.00.19 - кріобіологія, а її автор заслуговує присудження їй цього ступеня.

Старший науковий співробітник
Інституту сцинтиляційних
матеріалів НАН України,
кандидат біологічних наук



Н.С. Кавок

*Сираськемість підпису
Кавок Н.С. - засвідчує
належність до відділу кадрів
Інституту сцинтиляційних
матеріалів НАН України
Директор відділу кадрів О.В.
Кавок*

