

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Пакулової Ольги Костянтинівни «Осмотична поведінка еритроцитів людини при зміні аніонного складу середовища в умовах гіпотермії» поданої до спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

Актуальність теми дисертаційного дослідження.

Вдосконалення тривалого зберігання еритроцитів людини залишається одним з найбільш актуальних напрямів досліджень у сучасній кріобіології. Розуміння все більш детальних механізмів кріопошкодження дозволяє розробити методи кріоконсервування, які мінімально змінюють нативну структуру та функцію клітин. Теперішній значний експериментальний матеріал дозволяє висунути декілька гіпотез щодо руйнування еритроцитів за умов зміни осмотичних та температурних чинників середовища, але ще мало вивчені реакції еритроцитів на зміну його ліотропних властивостей.

Відомо, що у процесах, які приводять до ініціації, формування та стабілізації трансмембранних пор ключову роль відіграє цитоскелет-мембранний комплекс, транспорт іонів та води, а також стан водних розчинів електролітів та неелектролітів у яких експонуються клітини. На сьогодні результати досліджень науковців усього світу свідчать про те, що усі вказані структури та явища змінюються під впливом аніонів ліотропного ряду, які розташовані у порядку посилення гідратації від хао- до космо-тропних: $\text{ClO}_4^- < \text{Br}^- < \text{Cl}^- < \text{Ac}^- < \text{F}^- < \text{SO}_4^{2-}$. Значні зусилля зосереджені також на вивченні ролі води у механізмах адаптації на молекулярно-клітинному рівні за допомогою ефекту ліотропних аніонів, що знаходить практичне використання на практиці у біотехнологічних виробництвах.

Тому, дослідження ліотропних ефектів аніонів на адаптацію еритроцитів до чинників кріопошкодження під час заморожування та розморожування дозволяє встановити закономірності руйнування клітин в залежності від стану води у середовищі, щоб цілеспрямовано використовувати ліотропні властивості речовин для захисту клітин при складанні кріозахисних середовищ та підборі кріопротекторів.

Зв'язок роботи з державними та галузевими програмами

Дисертаційне дослідження виконане в Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна МОН України відповідно до наукового напрямку роботи «Фізіолого-біохімічні та структурно-функціональні закономірності клітинної адаптації до дії екзо- та ендогенних чинників» (№ держ. реєстрації 0106U001584) та Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України НАНУ за темою «Механізми осмотичної та температурної чутливості клітин при дії модифікаторів цитоскелет-мембранного комплексу, амфифільних речовин та кріопротекторів» (№ держ. реєстрації 0104U006437).

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що вперше комплексно вивчено вплив ліотропних аніонів на адаптацію еритроцитів до основних чинників кріопошкодження та доведено, що шляхом реалізації є модифікація властивостей води у системі «клітина-вода-частинки». Вперше відмінностями у гідратації клітин в присутності різних аніонів ліотропного ряду обґрунтовано єдиний механізм гіпертонічних лізису та кріогемолізу еритроцитів, а також розгортання гіпертонічного кріогемолізу в часі.

Вперше показано зміни морфологічних та об'ємних характеристик еритроцитів під впливом ліотропних властивостей аніонів у помірно гіпертонічному середовищі та їх взаємозв'язок із рівнем гемолізу при подальшому гипер- та гіпотонічному навантаженні. Під час постгіпертонічного лізису антигемолітичний ефект лінійно зростає від хаотропних до космотропних аніонів, а гіпертонічні навантаження

пошкоджують клітини, які були перед інкубовані у присутності сильних хаотропних аніонів.

Вперше показано підвищення сильними хаотропними аніонами перхлорату чутливості клітин до гіпертонічного лізису у середовищах з рН 5,4. Вперше продемонстровано захисний вплив слабохаотропного Br^- під час гіпертонічного криогемолізу.

Вперше пояснено природу захисного ефекту слабкосмотропного ацетат-аніона при гіпертонічному навантаженні еритроцитів, яка обумовлена підвищеною гідратацією клітин шляхом слабкого цих аніонів зв'язку із водою та запропоновано метод оцінки захисних ліотропних властивостей розчинених речовин. Вперше продемонстровано захисний вплив еліпсоїдних наночастинок на еритроцити в умовах гіпертонічного лізису.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що дослідження обґрунтовують доцільність врахування ліотропних ефектів аніонів та інших частинок у середовищі для запобігання криопошкодженню клітин. Результати дисертаційної роботи допоможуть вдосконалити підходи до складання криозахисних середовищ та підбору криопротекторів. Виявлені закономірності впливу аніонів можуть використовуватися для подальшого дослідження механізмів криопошкодження та обґрунтування підходів до захисту клітин.

Результати дисертаційної роботи можуть використовуватися у навчальному процесі при підготовці студентів біологічних та медичних вищих навчальних закладів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації забезпечена коректним використанням сучасних, достатньо чутливих експериментальних методів досліджень, а саме: кріобіологічними методами моделювання впливу факторів криопошкодження; спектрофотометричним методом для визначення вмісту гемоглобіну у супернатанті; мікрогематокритним методом – для вимірювання відносного об'єму еритроцитів; методом оптичної

мікроскопії – для вивчення морфологічних показників еритроцитів; методом НВЧ-діелектрометрії (9,2 ГГц) – для визначення стану води у клітинних суспензіях; статистичним методом – для аналізу отриманих даних.

Проводилась оцінка нормальності розподілу кількісних показників проводилася відповідно до її результатів та кількості груп використовували або критерій Стюдента, критерій Манна-Уїтні або Крускала-Уолліса. Кількість вимірювань була достатньою для використаних методів (не менш 6 разів у двох паралельних пробах) та відмінності вважали статистично значущими за умови $p \leq 0,05$.

Основні наукові положення, висновки і рекомендації дисертаційної роботи ґрунтуються на всебічному аналізі отриманих результатів та використанні наукових положень сучасної теорії і практики кріобіології, достатньо обґрунтовані теоретичними та експериментальними дослідженнями, що проведені здобувачем. Зроблені висновки теоретично обґрунтовані, переконливі та повністю відповідають отриманим результатам.

Обсяг і структура дисертації. Текст викладено на 155 сторінках та проілюстровано 24 рисунками. Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати досліджень та їх обговорення, які представлені у 4-х підрозділах, узагальнення, висновки, список використаної літератури, що містить 180 джерел на 19 сторінках та 3 додатки.

У **вступі** автор обґрунтовує актуальність досліджуваної проблеми, формулює мету, завдання та методи дослідження, визначає наукову новизну і практичне значення отриманих результатів.

Розділ 1 (огляд літератури) написано з урахуванням сучасних наукових даних, які використовуються автором надалі при обговоренні отриманих результатів. Розділ містить 2 підрозділи, де у першому надається детальна інформація стосовно температурно-осмотичної адаптації еритроцитів до усіх видів досліджуваних модельних умов, які відповідають повному циклу заморожування-розморожування. Наведено дані щодо

вивчення ліотропного ефекту у галузі кріобіології вітчизняними та закордонними науковцями.

У другому підрозділі описано природу ліотропного ефекту іонів та основні гіпотези реалізації його впливу на воду та біоструктури. Наведено результати досліджень змін у стані білків та їх гелів, а також ліпідних шарів, які є мішенями кріопошкодження в еритроцитах. Таким чином освітлено усі основні елементи, які важливі для розуміння результатів експериментів та обґрунтування висновків відповідно сучасному рівню знань за обраним напрямом досліджень.

У розділі 2 (матеріали та методи дослідження) наведено опис схем експериментів, використаного обладнання та реактивів. Детально описані застосовані методи дослідження, серед яких: кріобіологічні – для моделювання основних чинників кріопошкодження еритроцитів при заморожуванні та розморожуванні; спектрофотометричний – для реєстрації рівня пошкодження еритроцитів через реєстрацію виходу гемоглобіну з клітин у супернатант; мікрогематокритний – для отримання інформації про об'єм клітин; фонометричний – для дослідження кислотно-основної рівноваги; осмометричний – для контролю осмотичного тиску середовищ; біофізичні методи – для порівняння стану води у суспензіях та середовищах без клітин; метод світлової мікроскопії із використанням термоприставки – для реєстрації змін у морфологічних характеристиках еритроцитів. Вірогідність отриманих результатів та висновків роботи підтверджуються статистичною обробкою.

Отже, обрані матеріали та методи є сучасними, достатньо чутливими та цілком дозволяють виконати сформульовані наукові завдання.

Розділ 3 (результати та обговорення) містить чотири підрозділи, де описані усі результати даного дослідження, отримані при виконанні поставлених завдань. Здобувачем було доведено, що ліотропні аніони по-різному впливають на усі етапи кріопошкодження клітин при заморожуванні та розморожуванні.

У першому підрозділі описуються результати щодо гіпертонічного лізису еритроцитів у 4 М розчині NaCl за умов початкової експозиції у середовищах помірної гіпертонії різного ступеню, які містили ліотропні аніони. Їх специфічні властивості проявляються у вигляді зміни рівня пошкодження та зсуву за віссю осмоляльності фаз адаптації клітин, їх реакції на охолодження та на рівень рН, а також морфологічній та об'ємній трансформації. Зроблено спробу пояснення найкращого захисного ефекту аніонів ацетату на прикладі наночастинок різної форми.

У другому підрозділі наведено результати щодо дослідження характеристик зв'язаної та вільної води методом НВЧ-діелектрометрії (9,2 ГГц) через зміни декременту статичної діелектричної проникності і частоти діелектричної релаксації у суспензіях еритроцитів та середовищах без клітин. Отримані результати пояснюють вплив аніонів ліотропного ряду на стан води в суспензіях еритроцитів та адаптацію еритроцитів до гіпертонічних умов.

Третій підрозділ містить результати досліджень концентраційних та часових залежностей руйнування еритроцитів через холодний шок в присутності ліотропних аніонів. Результати також свідчать за сенсibiliзаційний вплив найбільш ефективних ліотропних аніонів, який не залежить від змін у їх транспортуванні через мембрану клітин. Досліджено можливість нейтралізації впливу сильних хаотропних аніонів, який пошкоджує, слабо космотропними, що захищають.

У четвертому підрозділі викладено результати змін температурно-осмотичної поведінки еритроцитів в умовах дії чинників кріопошкодження при розморожуванні моделюванням постгіпертонічного шоку у різних температурних режимах. Отримані результати відповідають світовій біотехнологічній практиці використання ліотропних аніонів, де встановлено лінійне підвищення пошкодження з посиленням хаотропних властивостей аніонів в ліотропному ряді.

Експериментальну частину роботи завершує узагальнення результатів досліджень, в якому в стислій формі віддзеркалюється суть роботи.

Висновки. Автор формулює шість висновків, які об'єктивно віддзеркалюють сутність результатів дисертації та відповідають поставленим задачам та меті дослідження.

Список літератури включає достатню кількість сучасних робіт вітчизняних та закордонних авторів.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях та авторефераті. Автореферат показує основний зміст дисертації, основні положення якої повністю викладені у 14 надрукованих працях, серед яких 5 статей – у фахових наукових виданнях України (1 — входить до міжнародної наукової бази даних Index Copernicus International), 1 стаття — у спеціальному випуску закордонного наукового видання (Scopus), 1 стаття — у збірці матеріалів конференції (загалом 2 статті мають ідентифікатор DOI). Результати дослідження обговорено на 7 наукових форумах вітчизняного та міжнародного рівня.

Зауваження що стосуються оформлення та змісту дисертації та автореферату. Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка питань дискусійного характеру. Разом із тим, відзначаючи високий науковий та методичний рівень дисертаційної роботи, доречно зробити деякі зауваження:

1. В роботі проводили експерименти в діапазоні температур 37 – 0 °С, а в матеріалах та методах дослідження не описано, як проводили контроль температури.
 2. Чим обґрунтовано вибір саме цих ліотропних аніонів для досліджень?
 3. При обговоренні результатів ви використовуєте термін «дзвоникоподібні». Можете пояснити його.
 4. Текст дисертації містить поодинокі орфографічні помилки, окремі невдалі стилістичні вислови та друкарські помилки.
-

Слід зазначити, що окремі зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційного дослідження, а зауваження, що виникли до роботи носять здебільшого дискусійний характер.

Висновок про відповідність

В цілому кваліфікаційна наукова робота Пакулової О. К. є завершеною науковою працею і відповідає паспорту спеціальності 03.00.19 – кріобіологія. Зважаючи на актуальність і перспективність тематики дисертаційної роботи, наукову новизну отриманих автором результатів, теоретичне і практичне значення, зв'язок із науковими програмами і темами та широко висвітлення у вітчизняній та закордонній літературі, їх обговорення на міжнародних конференціях та симпозіумах вважаю, що дисертація Пакулової Ольги Костянтинівни «Осмотична поведінка еритроцитів людини при зміні аніонного складу середовища в умовах гіпотермії» відповідає вимогам Постанови Кабінету міністрів України «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами) і вимогам Міністерства освіти і науки України, а також паспорту спеціальності 03.00.19 – кріобіологія, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент
кандидат біологічних наук,
доцент кафедри хімії та біохімії
ім. професора О. В. Чечоткіна
Харківської державної зооветеринарної
академії

Підпис Денисової О.М. засвідчую
начальник відділу кадрів



О. М. Денисова

І.М. Москаленко

м. Харків, 20 квітня 2021 року.