

ВІДГУК

офіційного опонента д.б.н. Мартинюка В.С.

на дисертаційну роботу Пакулової Ольги Костянтинівни

«ОСМОТИЧНА ПОВЕДІНКА ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

ПРИ ЗМІНІ АНІОННОГО СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА

В УМОВАХ ГІПОТЕРМІЇ»,

подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

Актуальність роботи

На цей час сучасна кріобіологія є передовою міждисциплінарною наукою, яка вивчає стійкість живих організмів всіх рівнів організації до низьких температур. Особливо важливою практичною задачею цієї науки є розробка надійних способів кріоконсервації клітин, тканин та інших біологічних об'єктів, що потребує використання спеціальних речовин, які захищають біологічні структури від пошкодження під час їх заморожування і розморожування. Розробка нових методів кріоконсервації потребує в першу чергу ретельного вивчення не тільки біологічних, але і фізико-хімічних процесів, які відбуваються протягом кріобіологічних процедур.

Одним із актуальних наукових завдань кріобіології є забезпечення тривалого зберігання функціональної та структурної цілісності еритроцитів людини, яке напряму залежить від властивостей середовища, в якому знаходяться клітини. Серед ключових властивостей таких середовищ є їх осмотичний тиск, а також осмотичні параметри клітин. Не дивлячись на те, що осмотичні явища добре вивчені, тим не менш залишається багато питань, які стосуються впливу різних концентрацій іонів з різною осмотичною здатністю. Вже понад століття відомі так звані ліотропні ряди іонів, які відрізняються ступенем гідратації і осмотичною здатністю. Але біологічний вплив таких іонів з різною їх концентрацією і при різних температурах є непрогнозованим і малодослідженим, особливо у випадках складних іонних композицій, які

входять до складу спеціальних середовищ для кріоконсервування клітин. Результати досліджень свідчать про можливість контролювати стан біологічних об'єктів шляхом впливу ліотропних аніонів на гідратацію біологічних молекул і клітинних мембран. Але такі дослідження потребують використання сучасних методів оцінки фізико-хімічних властивостей водних розчинів ліотропних електролітів і водно-колоїдних систем. Зокрема, використання методів визначення діелектричної проникності дозволяє отримати більш детальну інформацію про стан водної фази при різних температурах, що є важливим для розробки нових методів кріоконсервації.

Окрім того важливо відмітити, що дисертаційна робота Пакулової О.К. виконана на базі двох провідних наукових установ України, а саме на базі кафедри фізіології людини та тварин біологічного факультету Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна в межах наукової теми «Фізіолого-біохімічні та структурно-функціональні закономірності клітинної адаптації до дії екзо- та ендогенних чинників» (номер державної реєстрації 0106U001584), а також у відділі Кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України в межах наукової теми «Механізми осмотичної та температурної чутливості клітин при дії модифікаторів цитоскелет-мембранного комплексу, амфіфільних речовин та кріопротекторів» (номер державної реєстрації 0104U006437).

Враховуючи вищенаведене, маю зробити висновок про те, що тема дослідження дисертації Пакулової О.К. є безперечно актуальною як з теоретичної, так і практичної точки зору.

Наукова новизна роботи



Дисертант вперше дослідив вплив комплексу аніонів ліотропного ряду на властивості еритроцитів людини в умовах моделювання основних чинників кріопшкодження.

Статистичний аналіз результатів експериментальних досліджень автор дисертації проводив на основі загальноприйнятих статистичних оцінок, зокрема розрахунку математичного очікування та середньої похибки математичного очікування. Порівняння статистичних вибірок проводили за алгоритмом t-критерію Стюдента та Манна-Уїтні або Краскела-Уоліса. Стандартний загальноприйнятий набір методів статистичного аналізу дозволив автору дисертації можливість отримати достовірні результати та зробити логічні і адекватні статистично обгрунтовані висновки.

В експериментальних розділах автор дисертації послідовно наводить результати власних досліджень. Зокрема, автор наводить дані про вплив різних ліотропних іонів на стійкість еритроцитів до гіпертонічного лізису, який викликається висококонцентрованим розчином хлориду натрію. В окремому розділі автор дисертації наводить дані діелектричних властивостей суспензій еритроцитів, зокрема з НВЧ-діелектрометрії у діапазоні частот, який відповідає дисперсії молекул води. Цей розділ безперечно особливо сильною стороною дисертаційного дослідження і наочно доводить той факт, що ліотропні іони різної природи по різному впливають на характер гідратації біологічних структур. В останньому експериментальному розділі авторка дисертації резюмує дані про адаптацію еритроцитів до постгіпертонічного лізису під впливом ліотропних іонів. Встановлена лінійна залежність ефектів від розташування аніонів у ліотропному ряді. Висловлюється гіпотеза, що ефекти визначаються в основному впливом ліотропних властивостей аніонів на зв'язки білків, від яких залежать як пружно-еластичні властивості мембрани, так і об'єм клітин. Важливо, що отримані результати корелюють з даними, отриманими під час дослідження об'ємних і морфологічних характеристик еритроцитів в умовах експозиції у помірно гіпертонічних розчинах. Це є додатковим аргументом щодо адекватності і достовірності отриманих даних в цілому.

Узагальнення результатів досліджень проведено на високому науковому рівні.

Загальна характеристика роботи

Дисертаційна робота Пакулової О.К. має традиційну структуру і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення та висновків зі списком літературних джерел, що використані у дисертаційній роботі. Робота супроводжується ємними анотаціями, викладеними українською та англійською мовами.

Дисертаційна робота викладена на 155 сторінках, проілюстрована 24 рисунками. 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, 3 додатки.

Мета і 6 задач, що дозволяють реалізувати мету роботи, викладені чітко і адекватно заявленій науковій проблемі, що вирішується дисертантом.

У розділі «Огляд літератури» автор проводить ретельний аналіз стану проблеми щодо відомих механізмів пошкодження клітин, зокрема еритроцитів, в умовах заморожування-розморожування. Акцентується увага на роль осмотичних механізмів у пошкодженні клітин та їх залежності від ліотропних властивостей іонів, які використовуються у середовищах для кріоконсервації. Сильною стороною огляду літератури є те, що окремо розглядаються ефекти ліотропних іонів на молекулярному, субклітинному і клітинному рівні.

В розділі дисертаційної роботи «Матеріали і методи» автором достатньо повно наведено інформацію про загальну структуру експериментального дослідження, про використані об'єкти і матеріали дослідження, детально описано всі методи і методичні прийоми, які використовував дисертант. Сильною методичною стороною роботи є використання сучасного методу визначення діелектричних властивостей суспензії еритроцитів, що є важливим для з'ясування ролі ступеню гідратації мембрани еритроцитів та компонентів середовища у кріопшкодженні клітин.

Автором дисертації вперше встановлено закономірності адаптації клітин до присутності хао- та космотропних аніонів у фізіологічних середовищах, а також до зсуву осмоляльності та температури середовищ.

Вперше виявлено взаємозв'язок між перебігом гіпертонічного лізису та гіпертонічного криогемолізу. Встановлена причина такої кореляції, яка полягає у сенсibiliзації еритроцитів до обох видів впливу після попередньої інкубації у середовищах однакової осмоляльності.

Вперше доведено, що величина критичної осмоляльності залежить від розташування аніонів у ліотропному ряді, як і ступінь гідратації клітин у присутності ліотропних іонів.

Вперше продемонстровано підвищення адаптивної пластичності клітин за умов гіпертонічного криогемолізу в присутності слабохаотропного Br-, яке відбувається без пошкодження мембран під час тривалої передінкубації та пояснено природу захисного ефекту слабкосмотропного Ac- через підвищення ступеня гідратації клітин.

Вперше показано стабілізуючий вплив середовищ із низьким рН (5,4) у присутності сильних хаотропних аніонів в умовах гіпертонічних навантажень.

Вперше уточнено дані щодо впливу температури на температурно-осмотичну реакцію клітин у присутності хао- та космотропних аніонів.

Уперше встановлено зменшення рівня постгіпертонічного лізису еритроцитів із посиленням космотропних властивостей аніонів, що корелює з особливостями змін морфологічних та об'ємних характеристик еритроцитів за температурно-осмотичного навантаження.

Вперше визначено антигемолітичну активність ортованадатних наночастинок із різним формфактором при гіпертонічному лізисі еритроцитів.

Теоретичне і практичне значення роботи

Результати, отримані автором, безперечно мають важливе теретичне і практичне значення. По-перше, вони наочно демонструють доцільність використання аніонів ліотропного ряду для регуляції температурно-осмотичної

реакції клітин для покращення їх стійкості до умов заморожування-розморожування. Отримані у роботі наукові результати дозволять розробляти нові кріопротектори та ефективні кріозахисні середовища. Виявлені закономірності впливу аніонів можуть бути використані у подальших дослідженнях механізмів гідратації біологічних структур, а також кріопошкодження. Результати безперечно можуть бути використані у навчальному процесі для підготовки фахівців у галузі кріобіології, фармакології, біофізики та інших суміжних напрямів діяльності.

Особистий внесок здобувача

Особистий внесок здобувача є достатнім. Він полягає у самостійному аналізі літературних даних, проведенні експериментальних досліджень та узагальненні отриманих результатів, оформленні роботи і підготовці публікацій разом з науковим керівником та іншими співавторами.

Апробація роботи і публікації

Апробація результатів дисертації відбулась на 8-ми наукових конференціях державного і міжнародного рівня, що достатнім для їх широкого фахового обговорення. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць: 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, яке входить до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, 1 стаття – у збірці матеріалів конференції (загалом 2 наукові статті мають ідентифікатор DOI) та 7 тез доповідей на українських та міжнародних конференціях і симпозіумах.

Висновки дисертаційної роботи складаються з 6 пунктів. Вони логічно випливають з отриманих результатів і повністю відповідають на питання, які позначені у задачах дослідження. В цілому висновки свідчать про те, що авторка дисертації досягла мети дослідження і отримала важливі у теоретичному і практичному сенсі знання про вплив ліотропних іонів на еритроцити і шляхи їх використання у кріобіології.

Зауваження

1. Автор дисертації використовує такий термін, як стрес, зокрема стрес еритроцитів. У опонента склалось враження, що під цим терміном дисертант має на увазі наслідки пошкоджуючої дії фізико-хімічних факторів на клітини еритроциту. Відомо, що стрес-реакція, зокрема клітинний стрес – це алгоритмічна запрограмована неспецифічна адаптаційна реакція клітини на дію хімічних і фізичних факторів в межах її структурно-функціональних можливостей, які генетично детерміновані. Було б добре якщо б авторка дисертації у своїй роботі більш конкретно визначила це поняття і пояснила, який сенс вона вкладає у поняття стресу.
2. Авторка дисертації також використовує такий термін, як адаптація, зокрема адаптація еритроцитів. Враховуючи зв'язок цього зауваження з першим зауваженням, було б добре якщо б авторка дисертації у своїй роботі більш конкретно визначила це поняття і пояснила, який сенс вона вкладає у поняття адаптації.
3. Червоною лінією у дисертації йде проблема гідратації біологічних структур і фізико-хімічних властивостей водної фази у присутності ліотропних іонів. Часто процес гідратації уявляють дуже спрощено, зокрема, як орієнтацію диполів молекул води навколо іонів. Але більш точно гідратацію іонів у водних розчинах слід розглядати не як електростатичне зв'язування ними певної кількості молекул води, а як результат впливу іонів на тепловий і трансляційний рух молекул води. У

зв'язку з цим вводиться поняття «позитивної» і «негативної» гідратації. Дисертантка фактично досліджує саме рухливість молекул води, використовуючи метод НВЧ-діелектрометрії. Тому виникає питання, чому авторка дисертації не використала саме таку термінологію и такі теоретичні уявлення?

4. В огляді літератури дисертантка звертає увагу на загально відомий факт, що зміна у гідратації біологічних молекул або клітин може призводити до їх агрегації. З іншого боку авторка робить висновок про те, що ліотропні іони дійсно по різному впливають на гідратацію біологічних структур, що може бути важливим фактором при пошкодженні клітин при заморожуванні-розморожуванні. Чи спостерігала авторка дисертації зміну агрегації еритроцитів, і якщо так, то яким чином це враховувалось при інтерпретації результатів і поясненні біофізичних механізмів впливу фізико-хімічних факторів?
5. В огляді літератури авторка дисертації звертає увагу на вплив ліотропних іонів на розчинність газів у водних розчинах і посилається на дослідження, які свідчать про можливий вплив нанобульбашок газової фази у водних середовищах на структурні і функціональні властивості еритроцитів. Нажаль, в експериментальних розділах про це нічого не говориться. Було б дуже слушно, якщо б дисертантка висловила свою думку з цього питання у обговоренні власних результатів дослідження.
6. В дисертації зустрічаються граматичні помилки та певні стилістичні недоліки, наприклад «прикордонна» вода, тощо.

Не дивлячись на зауваження дисертаційна робота в цілому справляє хороше враження, вона виконана на високому професійному науковому і науково-методичному рівні, гарно написана і оформлена, матеріал легко сприймається і є цікавим для широкого кола дослідників не тільки в галузі кріобіології і кріомедицини, але і біохімії, біофізики, фізичної хімії та інших суміжних наук.

Відповідність дисертації вимогам ДАК МОН України

Аналіз матеріалів дисертації Пакулової Ольги Костянтинівни «ОСМОТИЧНА ПОВЕДІНКА ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ПРИ ЗМІНІ АНІОННОГО СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА В УМОВАХ ГІПОТЕРМІЇ» за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія, свідчить про те, що дисертаційна робота є завершеним, самостійно виконаним системним науковим дослідженням. В представленій до захисту дисертаційній роботі одержано нові, важливі як у теоретичному, так і в практичному аспекті результати, які можуть бути основою для подальших досліджень. Наукові положення, висновки і рекомендації, які сформульовані у дисертації і авторефераті дисертаційної роботи, викладені в опублікованих працях. Результати досліджень апробовано на наукових конференціях державного і міжнародного рівня. Зміст автореферату ідентичний до основних положень дисертації. У зв'язку з цим вважаю, що за своєю актуальністю, високим науково-методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною одержаних результатів, повнотою відображення результатів роботи у фахових виданнях, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертаційна робота 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. Автор заслуговує на присудження йому вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент, д.б.н., професор,
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету

імені Тараса Шевченка



В.С. Мартинюк