

ВІДГУК

офіційного опонента
на дисертаційну роботу **Чабаненко Олени Олексіївни**
за темою **«Реакція еритроцитів ссавців на постгіпертонічний шок і
видалення кріопротектору після заморожування»**,
подану до спеціалізованої вченої ради в
Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України на
здобуття доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія
за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми дисертації.

Наразі проблема кріоконсервування еритроцитів залишається актуальною і потребує нових практичних і теоретичних підходів для її розв'язання. Дисертаційна робота Чабаненко Олени Олексіївни «Реакція еритроцитів ссавців на постгіпертонічний шок і видалення кріопротектору після заморожування» виконана в межах тематики відділу кріоцитології і є продовженням наукового напрямку дослідження, спрямованого на вивчення впливу факторів кріопошкодження на еритроцити ссавців за умов заморожування-розморожування.

Незважаючи на певні досягнення при дослідженні процесів, що протікають на етапах низькотемпературного консервування біологічних об'єктів, до теперішнього часу багато питань щодо механізмів кріопошкодження і кріозахисту не вирішені і залишаються однією з актуальних проблем сучасної кріобіології. У процесі розморожування еритроцитів внаслідок танення льоду спостерігається різке зниження осмоляльності середовища, що може призводити до загибелі клітин. Пошук нових ефективних підходів, спрямованих на подолання негативного впливу зміни тонічності позаклітинного середовища, є підґрунтям для удосконалення існуючих методів кріоконсервування еритроцитів. В якості експериментальної моделі для вивчення впливу на еритроцити факторів кріопошкодження, що діють на етапі розморожування, використовують постгіпертонічний шок. Дослідження щодо попередження розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів за умов постгіпертонічного шоку є актуальними, але наразі роботи, спрямовані на

корекцію постгіпертонічного пошкодження еритроцитів, нечисленні і суперечливі. Нещодавно виявлений антигемолітичний ефект хлорпромазину за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів людини став приводом для застосування здобувачем низки амфифільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин, з метою вирішення проблеми збереження еритроцитів. Оскільки ефект амфифільних сполук реалізується на рівні мембрани, тому застосування в роботі еритроцитів тварин, мембрани яких відрізняються білково-ліпідним складом від еритроцитарних мембран людини, є перспективним напрямком досліджень. Такий підхід дозволяє з великою часткою ймовірності визначити значимість того чи іншого компонента або системи клітини в розвитку її стійкості до дії постгіпертонічного шоку, а також зрозуміти механізм дії мембранотропних речовин. З метою довгострокового зберігання еритроцитів людини широко використовують методи низькотемпературного консервування під захистом гліцерину. Оскільки гліцерин є проникним кріопротектором, що обумовлює необхідність його видалення з розморожених еритроцитів, тому застосування амфифільних сполук, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин, на етапі дегліцеринізації розморожених клітин є важливим, своєчасним й актуальним.

Проведене здобувачем дослідження може бути підґрунтям щодо удосконалення методу довгострокового зберігання еритроцитів за низької температури із використанням в якості кріопротектору гліцерину та можуть бути застосованими у практиці служби крові. Останнє безумовно актуальне у зв'язку з обмеженням запасів донорської крові людини в Україні через проведення бойових дій.

Таким чином, оцінюючи стан проблеми в цілому, мету і завдання дисертаційної роботи Чабаненко О.О. можна дійти висновку, що тема роботи є актуальною і сучасною, а дослідження ґрунтується на досягненнях кріобіології, теоретичної та прикладної біології.

Зв'язок роботи з державними та галузевими програмами.

Робота виконана в рамках відомчих науково-дослідних робіт відділу кріоцитології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за темами: «Дослідження чутливості еритроцитів ссавців до охолодження, дегідратації та заморожування при дії модифікуючих факторів і кріопротекторів» (номер державної реєстрації 0114U0001318); «Вивчення механізмів кріопшкодження еритроцитів ссавців на моделі постгіпертонічного шоку і після розморожування» номер державної реєстрації 0119U100441), де автор самостійно виконувала окремі розділи.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність.

Планування дослідів, послідовність експериментальних досліджень, методи, що були використані, цілком адекватні вирішенню поставлених завдань, забезпечується висококваліфікованим аналізом літературних джерел. Достовірність одержаних результатів обумовлюється розумно вибраними методами статистичної обробки. Зроблені автором висновки логічно випливають з наведених результатів. Все це свідчить про обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій, висунутих дисертантом, і дозволяють вважати, що дисертаційна робота є доцільною.

Наукова новизна отриманих результатів.

Автором *вперше* показана висока антигемолітична активність амфифільних сполук, які належать до різних класів поверхнево-активних речовин, за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів ссавців за температури 0°C. Отримані *нові оригінальні результати* щодо стійкості до подальшого нагрівання (0÷37°C) еритроцитів людини, які збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку і різних амфифільних сполук (0°C). Слід зазначити, що *вперше* модель постгіпертонічного шоку еритроцитів була доповнена дослідженнями із залученням проникного кріопротектору гліцерину. *Отримані нові результати* щодо розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини при застосуванні на етапі дегідратації комбінованих середовищ, що

містять гліцерин і хлорид натрію в різних співвідношеннях (за умов незмінної загальної осмоляльності середовища). Особливої оцінки заслуговує те, що при видаленні гліцерину з розморожених еритроцитів людини *вперше показана* ефективність амфіфільних сполук, які є представниками різних класів поверхнево-активних речовин.

Практичне значення отриманих результатів.

Результати досліджень, що стосуються вивчення впливу амфіфільних сполук на постгіпертонічний шок еритроцитів можуть бути використаним для підвищення стійкості клітин за екстремальних умов. Отримані експериментальні дані щодо ефективності представників катіонних, аніонних і неіонних амфіфільних сполук під час дегліцеринізації розморожених еритроцитів людини значно розширюють базу для подальшого пошуку мембранотропних сполук природного походження, здатних проявляти антигемолітичну активність на етапі видалення гліцерину з клітин. Результати дисертаційної роботи можуть бути рекомендовані для використання в навчальному процесі під час підготовки фахівців у галузі кріобіології, фармакології, мембранології.

Обсяг, структура і зміст дисертації.

Дисертаційна робота викладена за традиційною схемою на 202 сторінках машинописного тексту і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Список літератури містить 235 джерел, у тому числі 140 зарубіжних, розміщених на 29 сторінках тексту. Робота проілюстрована 14 таблицями та 45 рисунками, з яких 8 – мікрофотографій.

Роботу розпочинає анотація, викладена українською та англійською мовами, зі списком публікацій здобувача. Анотація створює змістовне уявлення про дисертаційну роботу, тобто висвітлює основні результати та наукові положення. Далі наведено перелік умовних позначень, котрий полегшує сприйняття матеріалу дисертаційної роботи.

У **вступі** наявні всі необхідні складові, які сформульовані належним чином. Переконаливо обґрунтовано актуальність дисертаційної роботи, вдало сформульовано мету та наведені п'ять завдань для її досягнення, представлено наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, подано інформацію щодо публікацій та апробації матеріалів дисертаційної роботи.

В **огляді літератури (розділ 1)** автор обґрунтовує актуальність вибору теми дисертації й обговорює ступінь вивченості проблеми. Цій розділ складається з 3-х підрозділів, в яких деталізовано викладено інформацію щодо ролі гліцерину в природі та при кріоконсервуванні еритроцитів; в історичному аспекті наведені дані щодо дослідження явища постгіпертонічного шоку еритроцитів та проаналізовані сучасні уявлення щодо впливу амфіфільних сполук на модельні та природні мембрани. Відображення й узагальнення автором сучасних літературних даних дозволяє добре висвітлити ще невирішені проблеми, а також чітко обґрунтувати мету та завдання дисертаційного дослідження.

Методична частина дисертаційної роботи (**розділ 2 «Матеріали і методи дослідження»**) написана досить докладно. У цьому розділі наведено опис схем експериментів із загальною характеристикою об'єктів дослідження. Проведене дослідження відповідає діючому законодавству України, вітчизняним та міжнародним біоетичним нормам. Об'єм взятої для аналізів крові з етичних міркувань був мінімальним, проте достатнім для забезпечення відтворюваних і значущих результатів.

Для досягнення поставленої мети автор використовує комплекс методів дослідження: кріобіологічний (метод швидкого заморожування еритроцитів із використанням кріоконсерванту ЦНДГПК 11₄ на основі гліцерину із подальшим видаленням кріопротектору способом трикратного серійного центрифугування), спектрофотометрія, світлова мікроскопія з використанням термоприставки, проточна цитофлуориметрія, осмометрія, рефрактометрія, методи математичної статистики. Використані методи є загальноприйнятими в даній галузі досліджень і добре доповнюють один одного.

Власні дослідження представлені у 3 розділах, де описані всі результати проведених досліджень, що отримані при виконанні поставлених завдань.

У **розділі 3** «Вплив амфифільних сполук на постгіпертонічний шок еритроцитів ссавців» автором представлені експериментальні результати щодо дослідження впливу амфифільних сполук, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин, на постгіпертонічний гемоліз еритроцитів людини, кролика та щура. Дисертантом зроблено висновок про високу антигемолітичну активність цих сполук за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів при 0°C, при цьому прояв ефективності амфифілів залежить від видової належності еритроцитів.

За допомогою спектрофотометричного і мікроскопічного методів здійснено оцінку стану еритроцитів, що збереглися після сумісної дії постгіпертонічного шоку (0°C) і відповідного амфифілу, і виявлено, що еритроцити людини, після застосування децилсульфату натрію, стійкі до подальшого нагрівання на відміну від трифторперазину і децил- β ,D-глюкопіранозиду. Розділ проілюстровано інформативними фотографіями, які добре відображають форму та кількість клітин. Методом проточної цитофлуориметрії показано зменшення кількості аннексін-мічених клітин зі зниженням концентрації децилсульфату натрію.

У **розділі 4** «Вплив гліцерину на чутливість еритроцитів людини до дії постгіпертонічного шоку» автором проаналізовано часові, концентраційні та температурні залежності постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини в присутності проникного кріопротектору гліцерину на різних етапах експерименту. Зроблено висновок щодо визначальної ролі етапу дегідратації у розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів у присутності кріопротектору. Встановлена температурно-залежна пошкоджувальна дія гліцерину за умов постгіпертонічного шоку еритроцитів: при 0°C реєструється високий рівень гемолізу еритроцитів, який знижується в діапазоні температур від 5 до 25°C.

Спираючись на результати багатоетапного експерименту з дослідження розвитку постгіпертонічного гемолізу еритроцитів при використанні на етапі дегідратації комбінованих середовищ, що містять гліцерин та хлорид натрію у різних співвідношеннях (при незмінній сумарній осмоляльності середовища), обговорюється можливий механізм дії гліцерину

Розділ 5 «Застосування амфіфільних сполук на етапі видалення гліцерину з кріоконсервованих еритроцитів» присвячений висвітленню результатів щодо використання представників катіонних, аніонних і неіонних амфіфільних сполук на етапі дегліцеринізації еритроцитів, попередньо заморожених до -196°C . Автором застосовано рекомендований МОЗ України спосіб консервування клітин донорської крові з використанням кріоконсерванту ЦНДІГПК 11₄ на основі гліцерину. В результаті ретельного експериментального дослідження дисертантом встановлено зниження рівня гемолізу еритроцитів на етапі видалення гліцерину із розморожених еритроцитів при використанні амфіфільних сполук, що належать до різних класів поверхнево-активних речовин. Показано, що при видаленні гліцерину із кріоконсервованих еритроцитів амфіфільні сполуки проявляють високу антигемолітичну активність, при цьому більш ефективним був неіонний децил- β ,D-глюкопіранозид. Слід зазначити, що отримані експериментальні дані щодо ефективності низки амфіфільних сполук під час дегліцеринізації розморожених еритроцитів людини є перспективними та надихають дослідників для пошуку сполук природного походження.

Експериментальну частину роботи завершує **узагальнення та обговорення результатів**, в якому в стислій формі відображається суть роботи.

Автор формулює **п'ять висновків**, які загалом відображають сутність отриманих результатів і відповідають поставленим завданням. Завершують дисертаційну роботу список використаних джерел та два додатки, які містять список публікацій здобувача за темою дисертації (додаток А) та відомості про апробацію результатів дисертації (додаток Б) – обов'язкові, відповідно до актуальних вимог з оформлення дисертацій.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях.

Основні положення та наукові результати дисертаційної роботи викладені у численних публікаціях, в тому числі наукових статтях, опублікованих у журналах з високим рейтингом. Матеріали дисертації відображені в 23 наукових працях, серед яких 6 статей у наукових фахових виданнях (2 з них цитуються у міжнародній науко метричній базі Scopus) та 3 статті у інших наукових виданнях. Результати роботи добре апробовані на 14 вітчизняних і міжнародних конференціях, частіше з особистою участю.

Перелік опублікованих робіт разом із відомостями про апробацію результатів дисертаційного дослідження наведено у додатках.

Зауваження та запитання щодо змісту дисертації.

Принципових зауважень до дисертаційної роботи немає. До *дискусійних питань* можна віднести наступне:

1. Чим обґрунтований вибір саме цих амфифільних сполук для досліджень?
2. У роботі ви використовували термін «дегліцеринізація». Наскільки він є загальноприйнятим?
3. Чи проводили ви дослідження щодо визначення мікровезикуляції еритроцитів під дією амфифільних сполук?

В якості *побажання* 1) провести роботу щодо оформлення експериментального матеріалу у вигляді патенту,

2) при проведенні подальших досліджень приділити увагу вивченню морфологічних особливостей еритроцитів за умов дегліцеринізації з використанням амфифільних сполук

Загальний висновок та оцінка дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота Чабаненко Олени Олексіївни за темою «Реакція еритроцитів ссавців на постгіпертонічний шок і видалення кріопротектору після заморожування» є цільною, самостійною, завершеною науковою працею

та має вагомe наукове та практичне значення. Зміст дисертаційної роботи відповідає зазначеній меті та поставленим завданням, які повністю вирішені у процесі дослідження. Дисертаційна робота не містить запозичених висновків інших авторів та відповідає вимогам академічної доброчесності. Основні положення дисертації доповідались на вітчизняних та закордонних науково-практичних конференціях, опубліковані у наукових виданнях з тематики дослідження.

Дисертаційна робота за змістом, структурою та оформленням відповідає галузі знань 09 – Біологія, спеціальності 091 – Біологія, відповідає вимогам Наказу Міністерства освіти і науки України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» від 12.01.2017 р. №40 та «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 29.10.2020 р. №167 (зі змінами). Автор дисертаційної роботи Чабаненко Олена Олексіївна на основі публічного захисту заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 – Біологія.

Офіційний опонент

доктор біологічних наук, професор,
завідувач лабораторії фармакології

Державної установи «Інститут проблем
ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського
Національної академії медичних наук України»

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
"ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ
ПАТОЛОГІЇ ІМ. В. Я. ДАНИЛЕВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"
ПІДПИС ЗАВІРЯЮ:

(підпис) *(підпис)*

20 р.



Малова Н.Г.