

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Дудецької Галини Вадимівни «Вплив факторів кріоконсервування на зонально диференційовані популяції адреноцитів тварин», що подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія до спеціалізованої вченої ради ДФ 64.242.002 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Актуальність теми. Трансплантація гормонопродукуючих тканин і клітин на сьогодні є одним з перспективних методів корекції недостатності відповідних ендокринних залоз. Кріоконсервування є найбільш оптимальним способом довгострокового зберігання клітин та тканин для наступної трансплантації. Ефективність того чи іншого режиму кріоконсервування визначається збереженням властивостей деконсервованого матеріалу, які є специфічними для різних типів клітин і тканин. Переважна кількість наукових даних щодо ефективності кріоконсервування надниркових залоз стосується збереження гормональної активності за рівнем глюкокортикоїдів. При цьому можливість збереження мінералопродукуючої функції клітин після кріоконсервування в літературі описана недостатньо. У зв'язку з цим актуальним є вивчення впливу різних факторів кріоконсервування на морфофункціональні особливості зонально диференційованих клітин надниркових залоз.

Здобувачем чітко сформульовані задачі та запропонована концепція їх вирішення з урахуванням сучасних напрямків розвитку науки та використання нових методик.

Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (шифр 2.2.6.104, номер держреєстрації 0116U003494).

Наукова новизна отриманих результатів полягає в тому, що:

- 1) Вперше проведений розподіл загальної суспензії клітин наднирників у градієнті щільності фіколу, який дозволив виділити фракції клітин, кожна з яких збагачена зоноспецифічним типом клітин, що підтверджувалось гістохімічними методами.
- 2) Встановлено, що насичення в розчинах ДМСО при температурі 4°C є найбільш сприятливим для загальної суспензії клітин і для суспензії клітин коркової речовини надниркових залоз.
- 3) Вперше були визначені коефіцієнти проникності мембран клітин коркової і мозкової речовини надниркових залоз для молекул води і ДМСО, визначені значення енергій активації процесів переносу цих речовин крізь мембрани клітин, а також зроблена спроба зв'язати збереженість загальної суспензії клітин після кріоконсервування в розчинах ДМСО з різними швидкостями охолодження зі значеннями коефіцієнтів проникності клітинних мембран.
- 4) Встановлено, що низькі швидкості охолодження (1, 5, 10 °C/хв) дозволяють зберегти найбільшу кількість загальної суспензії клітин і клітин коркової речовини.
- 5) Вперше встановлено, що кріоконсервування загальної суспензії клітин зі швидкістю охолодження 10 °C/хв в присутності 7 % ДМСО (насичення при 4 °C) забезпечувало максимальну кількість збережених стероїдпродукуючих клітин, які після відігрівання зберігали морфологічні та функціональні властивості, подібні нативній культурі клітин.

Ступінь обґрунтованості. При виконанні роботи автор використовував сучасні методи досліджень; для отримання даних було проведено достатню кількість експериментів, дані були проаналізовані з використанням адекватних статистичних методів. Отримані висновки дисертації повністю відповідають зазначеним задачам дослідження.

Структура дисертації. Дисертаційна робота Дудецької Г.В. має традиційну структуру і містить наступні розділи: анотацію, перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, три розділи власних досліджень, узагальнення, висновки, список використаних джерел літератури.

Вступ. В цьому розділі автор лаконічно і чітко формулює актуальність, наукову новизну і практичне значення роботи, визначає мету роботи і задачі, необхідні для її вирішення.

Слід зазначити **повноту апробації роботи.** Автор приймала участь в 19 міжнародних і національних наукових конференціях.

Огляд літератури містить 4 підрозділи, в яких наведені сучасні дані про морфофункціональні особливості надниркових залоз, регуляцію їх гормонопродукуючої активності, культивування і кріоконсервування клітин надниркових залоз.

У розділі **Матеріали і методи дослідження** докладно описані методики досліджень. Структура розділу загальноприйнята, логічна. Статистичні методи адекватні. Експерименти на лабораторних тваринах проводилися відповідно діючих нормативних документів щодо гуманної поведінки з тваринами і відповідають принципам біоетики.

Власні дослідження представлено в 3 розділах, проілюстровано 7 таблицями, 43 рисунками і 7 мікрофотографіями.

Розділ 3 присвячено розподілу в градієнті щільності фіколу та характеристиці зонально-диференційованих популяцій клітин, отриманих з загальної суспензії клітин надниркових залоз.

Для оцінювання функціональних і фенотипових характеристик отриманих клітинних фракцій використовували ряд наступних методів дослідження: суправітальне забарвлення трипановим синім, метод проточної цитофлюориметрії (ФДА, ПЙ, TER119), гістохімічний метод (виявлення ферменту 3 β -ГСД та гранул, що містять аміни), світлову та флуоресцентну мікроскопію (ФДА, ПЙ, НЧ, JC1), колориметричний метод визначення

метаболічної активності клітин (МТТ-тест), культивування, визначення рівня альдостерону.

Метод розподілу загальної суспензії клітин надниркових залоз щурів в градієнті щільності фіколу дозволив отримати 3 фракції клітин, збагачені зоноспецифічним клітинним типом. Так, у фракції 2 в основному знаходяться хромафінні клітини, що підтверджується гістохімічним методом на виявлення гранул, що містять аміни. У фракції 1 і фракції 3 в основному сконцентровані стероїдпродукуючі клітини, які характеризуються достовірно високим відсотковим вмістом 3β -ГСД⁺ і НЧ⁺ клітин.

Крім того, для підтвердження факту, що у фракціях 1 і 3 в основному сконцентровані стероїдпродукуючі клітини, було проведено розподіл в градієнті щільності фіколу суспензії клітин коркової речовини надниркових залоз, отриманої механічним способом. Такого виду суспензія клітин виявилася відносно гомогенною щодо вмісту стероїдпродукуючих клітин. Було отримано збільшення кількості 3β -ГСД⁺ і НЧ⁺ клітин для даних фракцій. Вимірювання альдостерону в середовищі культивування показало достовірно високі значення продукції альдостерону для фракції 3.

Розділ 4 присвячено вивченню впливу розчинів ДМСО і температури інкубації на функціональну активність та осмотичну поведінку клітин надниркових залоз. В підрозділі 4.1 автором встановлено відмінність поведінки досліджених типів клітин в залежності від температури інкубації (+4°C, +22°C, +37°C). Підвищення температури до 37 °C підсилювала токсичну дію ДМСО для клітин, які належать до клітин коркової речовини. Причому для клітин мозкової речовини, отриманих як механічним способом, так і шляхом розподілу в градієнті щільності фіколу, такої залежності автором виявлено не було. У підрозділі 4.2 наведено дані з визначення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран клітин надниркових залоз для молекул води і кріопротектору. Показано, що значення коефіцієнтів проникності для молекул ДМСО збільшуються з підвищенням температури і концентрації кріопротектору в розчині. Встановлено, що проникність плазматичної

мембрани клітин коркової речовини при температурі 22 і 37 °С вище, ніж у клітин мозкової речовини, причому при 37 °С цей показник значно підвищується. Було визначено енергію активації в температурному інтервалі 4 – 37 °С для обох видів клітин. На підставі отриманих даних, автором було зроблено припущення, що проникнення молекул ДМСО крізь плазматичну мембрану клітин кори відбувається крізь ліпідний бішар і білкові канали, а у випадку клітин мозкової речовини проникнення молекул ДМСО відбувається переважно крізь ліпідний бішар.

У **Розділі 5** представлено дані щодо впливу кріоконсервування у присутності різних концентрацій ДМСО і швидкостей охолодження на властивості загальної суспензії клітин надниркових залоз і на окремі фракції клітин. Даний розділ має 4 підрозділи. В підрозділах 5.1 і 5.2 представлено дані щодо збереженості і життєздатності загальної суспензії клітин надниркових залоз та окремих її популяцій. В підрозділі 5.3 подано дані цитофлуориметричного і флуоресцентного аналізу загальної суспензії клітин після кріоконсервування. Підрозділ 5.3 присвячено вивченню морфологічних характеристик первинної культури клітин надниркових залоз після кріоконсервування.

Кріоконсервування проводилось з використанням швидкостей охолодження 1, 5, 10, 15, 20, 40 °С/хв та шляхом прямого занурення в рідкий азот. В якості кріопротектору використовували ДМСО в концентрації 5, 7, 10 %. Автором встановлено, що заморожування з контрольованими швидкостями охолодження, вищими за 10 °С/хв, і використання неконтрольованих швидкостей охолодження значно знижує показники життєздатності стероїдпродукуючих клітин надниркових залоз щурів. Використання швидкості охолодження 10 °С/хв і 7 % ДМСО для заморожування надниркових залоз щурів сприяло збереженню найбільшої кількості 3β -ГСД⁺ та НЧ⁺ клітин, здатних до секреції альдостерону при наступному культивуванні протягом 14 діб.

В заключній частині здобувач логічно підводить підсумок проведених досліджень. Роботу завершують висновки, які в повній мірі відповідають поставленій меті і задачам роботи та впливають з проведених досліджень.

Повнота викладення матеріалів дисертації. Всі основні положення дисертаційної роботи у повній мірі відображені в наукових працях. За матеріалами дисертації в наукових фахових виданнях опубліковано 24 наукові роботи, серед яких 5 статей у наукових фахових виданнях, 2 з яких цитуються у міжнародній базі Scopus, та 19 тез доповідей міжнародних і національних наукових конференцій.

Академічна доброчесність. Дисертаційна робота оформлена відповідно до чинних нормативних вимог. Ознак порушення дисертантом академічної доброчесності не встановлено.

Зауваження до змісту дисертації.

При аналізі дисертаційної роботи виникли наступні зауваження та дискусійні питання.

1. На мій погляд, в розділі «Огляд літератури» не вистачає даних щодо механізмів об'ємних змін та регуляції гормонопродукуючої функції клітин під впливом осмотичних факторів.

2. У зв'язку з чим строк культивування клітин надниркових залоз складав саме 14 діб?

3. Розроблений в даній роботі режим кріоконсервування дозволяє зберегти високий відсоток клітин коркової речовини надниркових залоз. Чи можна вважати розроблений режим універсальним, що сприяє збереженню як глюкокортикоїд-, так і мінералокортикоїдпродукуючих клітин? Чи визначали Ви рівень кортикостерону в культуральному середовищі? Якщо визначали, то які були результати цих експериментів?

4. З чим Ви пов'яжете більш високу чутливість хромафінних клітин до впливу факторів кріоконсервування?

В цілому дисертаційна робота Дудецької Г.В. справляє позитивне враження. Принципових зауважень до змісту дисертації немає. Дані

експериментальних досліджень представлені в логічній послідовності відповідно до мети і поставлених задач.

Висновок. Дисертаційна робота Дудецької Галини Вадимівни «Вплив факторів кріоконсервування на зонально диференційовані популяції адреноцитів тварин», яка присвячена актуальному напрямку сучасної кріобіології, за актуальністю, об'ємом, рівнем проведених досліджень, науковою новизною та практичним значенням, особистим внеском автора та кількістю публікацій відповідає пункту 10 Постанови Кабінету Міністрів України № 167 від 29.10.2020 (зі змінами) «Про проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктор філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

Завідувач лабораторії фармакології
ДУ «Інститут проблем ендокринної
патології ім. В.Я. Данілевського
НАМН України»,
доктор біологічних наук, професор



Малова Н. Г.

