

## 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. На сьогоднішній день кріоконсервування широко застосовується для довгострокового зберігання ендокринних клітин та тканин для наступної трансплантації. Крім того, культура клітин є інструментом для вивчення механізмів регуляції синтезу і секреції гормонів *in vitro*, що також потребує розробки режимів заморожування, які б сприяли збереженню початкових властивостей деконсервованого матеріалу. В літературі існує достатньо даних щодо кріоконсервування клітин і тканин наднирників, однак більшість робіт стосується дослідження збереження глюкокортикоїдпродукуючої активності клітин і лише в декількох роботах представлені дані зі збереження синтезу і секреції мінералокортикоїдів клітинами надниркових залоз тварин після кріоконсервування. У зв'язку з цим наукова проблема, сформульована в дисертаційній роботі Дудецької Г.В., є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

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).

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

Достовірність отриманих результатів забезпечується належним об'ємом експериментальних даних (в роботі було використано 240 щурів та 30 мишей) та застосуванням сучасних методів дослідження, а саме: флуоресцентної мікроскопії, проточної цитофлюориметрії, колориметричного методу,

гістохімічного методу, методу волюмометрії, кріоконсервування, культивування, радіоімуннологічного методу визначення альдостерону, методів математичної статистики. Достовірність результатів дисертації не викликає сумнівів. Наукові положення та висновки роботи цілком обґрунтовані, повністю відповідають зазначеним задачам дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором *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. *Вперше* встановлено, що насичення в розчинах ДМСО при температурі 4 °С є найбільш сприятливим для загальної суспензії клітин і для суспензії клітин коркової речовини надниркових залоз. *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. *Вперше* встановлено, що низькі швидкості охолодження (1, 5, 10 °С/хв) дозволяють зберегти найбільшу кількість загальної суспензії клітин і клітин коркової речовини. *Вперше* встановлено, що кріоконсервування загальної суспензії клітин зі швидкістю охолодження 10 °С/хв в присутності 7 % ДМСО (насичення при 4 °С) забезпечувало максимальну кількість збережених стероїдпродукуючих клітин, які після відігріву зберігали морфологічні та функціональні властивості, подібні нативній культурі клітин.

Практичне значення отриманих результатів. Результати, отримані в роботі, мають практичне значення, оскільки визначення умов насичення зонально диференційованих клітин надниркових залоз кріопротектором ДМСО дозволять в подальшому скоротити час для розробки оптимальних способів кріоконсервування певної популяції клітин. Отримані автором значення коефіцієнтів проникності мембран клітин коркової і мозкової речовин для води і

кріопротектору і їх температурні залежності можуть бути використані при розробці нових і вдосконалення існуючих режимів кріоконсервування. Режим кріоконсервування, отриманий автором, який включає 2 етапи охолодження (I етап – зі швидкістю 10 °С/хв до -40 °С; II етап – занурення у рідкий азот) та використання кріозахисного середовища на основі 7 % ДМСО, є прийнятним для кріоконсервування загальної суспензії клітин надниркових залоз. Отримані нові дані про чутливість загальної суспензії клітин до осмотичних факторів та дії низьких температур, можуть бути використані для курсів лекцій і практичних занять студентів навчальних закладів біологічного профілю.

Апробація результатів дисертації. Автор приймала участь в 19 міжнародних і національних наукових конференціях.

#### Оцінка змісту дисертації

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 169 сторінках, включаючи список використаної літератури (278 джерела). Дисертаційна має традиційну структуру та містить: анотацію, вступ, зміст, перелік умовних позначень, огляд літератури, матеріали і методи, три розділи результатів власних досліджень, узагальнення результатів, висновки, перелік використаних джерел. Дисертаційну роботу проілюстровано 43 рисунками, 7 мікрофотографіями і 7 таблицями.

Вступ. У даному розділі визначено актуальність проблеми, мету та завдання роботи, сформульовано об'єкт і предмет дослідження, наукову новизну і практичне значення одержаних результатів. Відзначено особистий внесок здобувача, повноту апробації та обсяг дисертаційної роботи.

Огляд літератури містить 4 підрозділи, в яких наведені сучасні дані про структурно-функціональні особливості надниркових залоз, регуляцію їх гормонопродукуючої активності, культивування і кріоконсервування клітин надниркових залоз. Автором проведено пошук існуючих способів кріоконсервування клітин надниркових залоз, як у вигляді суспензії, так і фрагментів, органотипової культури. Аналіз літературних даних показав, що не існує розроблених режимів кріоконсервування надниркових залоз, які б

забезпечували високий рівень збереженості їх мінералопродукуючої функції після відігрівання.

Розділ «Матеріали і методи дослідження» представлено 23 підрозділами, в яких докладно описані методики, використані при виконанні дисертаційної роботи. Автором було використано сучасні методи дослідження та статистичного аналізу, які дозволили повною мірою виконати поставлені задачі, отримати вірогідні результати та зробити належні висновки.

Результати власних досліджень представлені в 3 розділах.

Розділ 3 «Розподіл та характеристика зонально-диференційованих популяцій клітин, отриманих із ЗСК надниркових залоз». В даному розділі роботи описано метод розподілу загальної суспензії клітин надниркових залоз на фракції, що містять морфологічно гомогенні популяції клітин та їх характеристику. Для ідентифікації клітин були використані наступні методи: виявлення ферменту 3 $\beta$ -ГСД, наявності ліпідних включень з використанням флуоресцентного барвника нільського червоного, гістохімічний метод виявлення амінів, вимірювання рівня альдостерону в середовищі інкубації радіоімунологічним методом. Клітини з ліпідними включеннями, в яких була виявлена також активність 3 $\beta$ -ГСД (3 $\beta$ -ГСД<sup>+</sup>), здатні до секреції альдостерону, були ідентифіковані автором як стероїдпродукуючі. Клітини, які містили гранули з адреналіном та норадреналіном, були ідентифіковані як хромафінні. Також автором був використаний метод подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками флуоресцеїдацетатом та пропідій йодидом для оцінки кількості без'ядерних об'єктів у популяціях клітин, що були отримані в градієнті щільності фіколу.

РОЗДІЛ 4 «Вплив розчинів диметилсульфоксиду і температури на властивості суспензії клітин надниркових залоз та на окремі її популяції клітин» представлено 2 підрозділами. В першому підрозділі представлено дані щодо виявлення цитотоксичності кріопротектору ДМСО в концентрації 5, 7, 10% при температурі 4, 22, 37 °С. Автором було встановлено, що ДМСО в концентрації 10 % при температурах 22 і 37 °С є токсичним як для загальної суспензії клітин, так і для клітин коркової речовини надниркових залоз. При цьому життєздатність

хромафінних клітин після інкубації в розчинах ДМСО становила  $80,51 \pm 2,65\%$  і не залежала ні від концентрації ДМСО, ні від температури насичення. В другому підрозділі автором визначені коефіцієнти проникності мембран клітин коркової і мозкової речовини наднирників для молекул кріопротектору при різних температурах. Отримані дані свідчать про збільшення коефіцієнтів проникності для молекул ДМСО з підвищенням температури і концентрації кріопротектора в розчині. Встановлено, що проникність плазматичної мембрани при температурі 22 і 37 °С вище для клітин кори надниркових залоз в порівнянні з хромафінними клітинами.

РОЗДІЛ 5. Вплив кріоконсервування у присутності різних концентрацій ДМСО і швидкостей охолодження на властивості ЗСК надниркових залоз і на окремі її популяції клітин. Цей розділ складається з 3 підрозділів, які присвячено вивченню впливу кріоконсервування на збереженість загальної суспензії клітин, окремих її фракцій, виділених в градієнті щільності фіколу, та клітин коркової і мозкової речовини, отриманих після механічного розподілу залози. Автором встановлено, що оптимальний режим кріоконсервування клітин надниркових залоз, який дозволяє зберегти їх життєздатність, кількість  $3\beta$ -ГСД<sup>+</sup> і НЧ<sup>+</sup> клітин на рівні контрольних значень, включає насичення загальної суспензії клітин 7 % ДМСО при 4 °С та двохетапне заморожування зі швидкістю охолодження 10 °С/хв до -40 °С з наступним зануренням у рідкий азот. Причому використання швидкостей охолодження, вищих за 10 °С/хв (20, 40 °С/хв і занурення в LN<sub>2</sub>) призводило до вірогідного зниження всіх досліджених показників. Автор показав, що клітини, кріоконсервовані за даним режимом, здатні формувати первинні культури та зберігати притаманний для контрольних зразків розподіл клітин і присутність мітотично активних клітин в популяції. Крім того, первинна культура зберігає здатність до синтезу та секреції альдостерону з максимумом на 2 добу культивування ( $406 \pm 2,35$  пг/10<sup>6</sup> кл), після чого спостерігалось зниження рівня гормональної активності кріоконсервованої культури, що корелювало з домінуванням фібробластоподібних клітин на 14 добу культивування.

У Розділі «Узагальнення та аналіз результатів» автором стисло та логічно наведені отримані дані, представлено їх обговорення з урахуванням сучасних наукових даних, отриманих вітчизняними та іноземними авторами.

Висновки відповідають поставленим задачам та відображають основний зміст дисертації.

Академічна доброчесність. Дисертаційна робота оформлена відповідно до чинних нормативних вимог. Автор надав посилання на всі роботи, що стосуються особливостей проведених ним досліджень. Вважаю, що робота повною мірою відповідає вимогам академічної доброчесності і не містить академічного плагіату.

Повнота викладення матеріалів дисертації в опублікованих працях. Всі матеріали дисертаційної роботи Дудецької Г.В. викладені в 24 працях, з них 5 статей, 2 з яких входять до міжнародної наукометричної бази Scopus, 19 тез у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

#### Зауваження та запитання щодо змісту дисертації.

1. Чи проводили Ви підбір умов культивування для клітин надниркових залоз? Чи не використовували Ви фідери для культивування клітин?
2. Чому Ви вважаєте оптимальним режим кріоконсервування зі швидкістю охолодження саме 10 °C/хв, якщо при цьому спостерігаєте зниження кількості клітин після відігрівання?
3. Чи вважаєте ви доцільним культивування окремих фракцій клітин? В чому перевага культивування цільної суспензії клітин?
4. На які параметри може впливати присутність побочної популяції клітин? Чи можливо усунути цей вплив при кріоконсервуванні?
5. Чи було Вами виявлено взаємозв'язок між включенням барвника JC1 у вигляді агрегатів та рівнем гормонопродукуючої активності клітин після кріоконсервування?

## ВИСНОВОК

Вважаю, що дисертаційна робота Дудецької Галини Вадимівни «Вплив факторів кріоконсервування на зонально диференційовані популяції адреноцитів тварин» є завершеною працею, яка за актуальністю теми, методичним рівнем проведених досліджень, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів відповідає п. 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.

Старший науковий співробітник  
відділу наноструктурних матеріалів  
ім. Ю.В. Малюкіна  
Інституту сцинтиляційних матеріалів  
Національної академії наук України,  
кандидат біологічних наук



Кавок Н.С.

Підпис Кавок Н.С. засвідчую:  
учений секретар ІСМА НАН України



Дацько Ю.М.