

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Улізко Павла Юрійовича

«Кріоконсервування еритроцитів ссавців із застосуванням комбінованих
кріозахисних середовищ»,

подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.19 – кріобіологія

Одним з важливих напрямів досліджень в сучасній кріобіології є розробка методів тривалого зберігання компонентів крові сільськогосподарських та домашніх тварин при низьких температурах в умовах кріобанків. Еритроцити різних видів ссавців потребують індивідуального підходу до розробки середовищ кріоконсервування, оскільки використання традиційних для еритроцитів людини кріозахисних середовищ недостатньо ефективно для еритроцитів сільськогосподарських та домашніх тварин. Тому тема дисертаційної роботи **Улізко П. Ю.** — визначення найбільш ефективного комбінованого кріозахисного середовища для кріоконсервування еритроцитів ссавців і дослідження збереженості цих клітин на етапах кріоконсервування є вельми **актуальною**. Про **актуальність** роботи також свідчить те, що вона виконувалась в рамках наукових держбюджетних тем «Експериментальна обробка та розробка методів кріоконсервування клітин та тканин домашніх та сільськогосподарських тварин, а також розробка методів отримання кріоекстрактів з ембріональних тканин тварин та вивчення їх біологічної активності» (№ державної реєстрації 0110U007535) та «Вплив кріоконсервування плаценти та її водно-сольових екстрактів на антиоксидантну та протизапальну дію екстрактів» (№ державної реєстрації 0116U003491). Вирішення задач, поставлених у роботі, а саме дослідити фізичні процеси в кріозахисних середовищах та суспензіях еритроцитів ссавців при низьких температурах, збереженість, рівень гемолізу, осмотичні властивості еритроцитів при кріоконсервуванні з комбінованими кріозахисними середовищами, є важливим як для розв'язання деяких **теоретичних питань** кріобіології, так і для **практичного застосування** при кріоконсервуванні еритроцитів ссавців.

Дисертаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, узагальнення результатів, висновків, переліка використаних джерел (171 посилання) та додатків. Загальний обсяг роботи складає 141 сторінку.

У **вступі** автор наводить детальне обґрунтування вибору теми дослідження, зазначає зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, наводить мету і завдання роботи, об'єкт і предмет дослідження, перелічує використані в роботі методи, зазначає

новизну, наукову і практичну значимість роботи, особистий внесок у роботу, наводить перелік вітчизняних та міжнародних конференцій, на яких були представлені матеріали дослідження, зазначає загальну кількість публікацій та загальну структуру дисертації.

У **Розділі 1** представлено огляд літератури, у якому аналізуються механізми кріопошкодження біологічних об'єктів, розглянуті види кріопротекторів та механізми їх дії, описані низькотемпературні фазові переходи у кріобіологічних системах (кристалізація, склування, рекристалізація, плавлення).

Розділ 2 присвячено опису матеріалів і методів дослідження. Зокрема описані методики приготування зразків еритроцитів бика, коня, кролика і людини, що досліджувались у роботі; зазначено склад багатокомпонентних кріозахисних середовищ з різною комбінацією проникальних і непроникальних кріопротекторів; описана методика заморожування, відігрівання та відмивання зразків еритроцитів. Детально описані методи дослідження, основними з яких є ДСК, флуоресцентна мікроскопія, цитофлуориметрія, спектрофотометрія.

У **розділі 3** представлені результати власних досліджень фазових переходів і склування у кріозахисних середовищах для кріоконсервування еритроцитів при температурах нижче 0°C (окремо в однокомпонентних і комбінованих кріозахисних середовищах), а також фазових переходів і склування у суспензіях еритроцитів ссавців при температурах нижче 0°C . Дослідження проводилось методом ДСК. За отриманими результатами автором рекомендована температура зберігання еритроцитів коня, бика і кролика в середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу нижче -95°C , що достовірно вище рекомендованої температури зберігання при використанні однокомпонентного розчину ДМСО (нижче -125°C).

У **розділі 4** наводяться результати дослідження збереженості еритроцитів на різних етапах кріоконсервування у присутності комбінованих кріозахисних середовищ, а саме проведена оцінка флуоресцентними методами ефективності комбінування проникального і непроникального кріопротекторів при кріоконсервуванні еритроцитів бика, коня і кролика та вплив складу кріоконсервуючого середовища на гемоліз еритроцитів ссавців на різних етапах кріоконсервування. Результати показали більш високу ефективність комбінованих кріозахисних середовищ порівняно з однокомпонентними, також було підібрано багатокомпонентне середовище (15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД, 5% сахарози), яке показало найбільшу ефективність на всіх етапах кріоконсервування еритроцитів.

Розділ 5 присвячено дослідженню осмотичної крихкості еритроцитів ссавців на різних етапах кріоконсервування та результатам моделювання трансфузії еритроцитів

коня, бика, кролика і людини після кріоконсервування у однокомпонентному і підбраному автором комбінованому кріозахисному середовищі. Отримані результати демонструють, що підбране автором багатокомпонентне кріозахисне середовище, яке містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 -ПД, 5% сахарози, дозволяє зберегти осмотичні властивості еритроцитів бика, кролика та коня у процесі кріоконсервування, а також в умовах моделювання трансфузії у аутологічній плазмі протягом доби отримати до 2-3% гемолізу після етапу інкубування та 5-6% гемолізу після всіх етапів кріоконсервування еритроцитів різних ссавців у комбінованому середовищі.

Окремо наприкінці роботи наводиться узагальнення отриманих автором результатів, більшість з яких є новими.

В цілому робота складає враження гарно спланованого і докладно проведеного дослідження. **Наукову новизну** підтверджує опублікування результатів у 9 статтях (2 з яких у наукових журналах іноземних країн та 1 у журналі, що входить до БД Scopus), апробація на 12 міжнародних і вітчизняних конференціях та отримання автором патента України на корисну модель, у яких повною мірою представлені всі отримані результати. Наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані у дисертації, є добре **обгрунтовані і достовірні**, мають суттєве **практичне значення**. Зміст автореферату ідентичний основним положенням дисертації.

Разом з тим, деякі місця тексту дисертаційної роботи викликають запитання та зауваження:

1. В огляді літератури приділено значну увагу питанням важливості контролю і підбору швидкостей охолодження та нагрівання зразків, що підлягають кріоконсервуванню, але у підрозділі 2.1 «Матеріали дослідження» в описі методики приготування зразків не зазначаються ні швидкості їх охолодження, ні швидкості нагрівання.

2. В роботі зазначається, що для перевірки статистичної значимості відмінностей числових показників використовували U-критерій Манна-Уїтні, але не наводиться обгрунтування його використання.

3. Відсутність кристалізації і плавлення евтектичних складів у багатокомпонентних середовищах з ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозою пов'язується з присутністю в середовищі сахарози, але не пояснюється чому (стор. 65). Утім у розчинах присутній ще 1,2-ПД, який, входячи до складу однокомпонентних середовищ в концентраціях від 10% до 35 %, теж демонструє відсутність кристалізації чи плавлення евтектичних складів (таблиця 3.1.1.1). Крім того, в чотирьох з восьми досліджених

багатокомпонентних середовищ, що не містили сахарози, також були відсутні кристалізація і плавлення евтектичних складів.

4. Автор припускає (стор. 81), що збільшення проникності мембран внаслідок їх пошкодження призводить до більш яскравого флуоресцентного забарвлення клітин, але тоді незрозуміло, чому найбільш яскраве забарвлення спостерігається для контролю у випадку еритроцитів коня (рис. 4.1.1 а).

5. Твердження, що незначна добавка в середовище сахарози дозволяє істотно зменшити гемоліз еритроцитів при заморожуванні (стор. 94) не підкріплюється даними, оскільки немає порівняння з середовищем того ж складу тільки без сахарози. Досліджені розчини, що не містять сахарози, не містять і 1,2-ПД.

Однак наведені зауваження не впливають на високу позитивну оцінку роботи. Дисертація **Улізко Павла Юрійовича** «Кріоконсервування еритроцитів ссавців із застосуванням комбінованих кріозахисних середовищ» є завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують наукову проблему ефективного кріоконсервування еритроцитів ссавців, що має суттєве значення для кріобіології, тваринництва та ветеринарної медицини.

За обсягом проведених досліджень, актуальністю, новизною і достовірністю отриманих результатів дисертація **Улізко Павла Юрійовича** «Кріоконсервування еритроцитів ссавців із застосуванням комбінованих кріозахисних середовищ» повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., а її автор — **Улізко Павло Юрійович** — заслуговує на присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент:

доцент кафедри молекулярної

та медичної біофізики

Харківського національного університету

імені В.Н. Каразіна, к.ф.-м.н.

О.О. Горобченко

Підпис засвідчую
Начальник служби управління
персоналом

