



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. І. ВЕРНАДСЬКОГО

V. I. VERNADSKY TAURIDA NATIONAL UNIVERSITY
вул. Джона Маккейна (І. Кудрі), 33, м. Київ, 01042, тел. (044) 529 05-16,
<http://tnu.edu.ua>, e-mail: crimea.tnu@gmail.com код ЄДРПОУ 02070967

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Улізка Павла Юрійовича

**«Кріоконсервування еритроцитів ссавців із застосуванням комбінованих
кріозахисних середовищ»,**

**поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія**

Актуальність теми дисертаційного дослідження.

Нагальною потребою сучасності є створення низькотемпературних банків крові тварин з метою подальшого її використання для потреб ветеринарної медицини. Однак еритроцити різних видів ссавців потребують індивідуального підходу до розробки середовищ кріоконсервування. Традиційні для еритроцитів людини кріозахисні середовища мають низьку ефективність при кріоконсервуванні еритроцитів багатьох свійських тварин.

Дисертаційна робота Улізка Павла Юрійовича «Кріоконсервування еритроцитів ссавців із застосуванням комбінованих кріозахисних середовищ» присвячена актуальній проблемі розробки ефективного комбінованого кріозахисного середовища для кріоконсервування еритроцитів ссавців. У роботі, на основі аналізу низькотемпературних фазових переходів у кріозахисних середовищах і суспензіях клітин, отримав розвиток перспективний напрям створення більш універсальних комбінованих кріоконсервантів для еритроцитів ссавців. Проведений порівняльний аналіз

кріозахисної ефективності розробленого у роботі комбінованого середовища з відомими однокомпонентними середовищами, продемонстрував його значну перспективність.

Зв'язок роботи з державними та галузевими програмами.

Дисертаційна робота Улізка П. Ю. виконана на базі кафедри хімії і біохімії Харківської державної зооветеринарної академії та відділу кріобіофізики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у рамках науково-дослідних 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).

Наукова новизна отриманих результатів.

У дисертаційній роботі вперше досліджені фізичні процеси в суспензіях еритроцитів ссавців з комбінованими кріозахисними середовищами при охолодженні до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ та проаналізовано закономірності впливу різних кріозахисних речовин на температури фазових переходів і склування у багатокомпонентних середовищах. Встановлено, що температура склування у комбінованому середовищі знижується при збільшенні концентрації ДМСО і підвищується при збільшенні концентрації ПЕО-1500 та при додаванні сахарози. Виявлено також, що температура склування еритроцитів в комбінованих кріозахисних середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу, підвищується в порівнянні з температурою склування однокомпонентних середовищ на основі ДМСО. Показано, що застосування комбінованих кріозахисних середовищ дозволяє уникнути розвитку кристалізації евтектичних складів, характерних при застосуванні в складі

кріозахисного середовища тільки ПЕО-1500 або ДМСО, що дозволяє виключити один з факторів кріопшкоджень.

Також у роботі вперше проаналізовано вплив зміни концентрації компонентів комбінованого середовища на рівень гемолізу еритроцитів бика, коня і кролика на різних етапах кріоконсервування. Виявлено, що використання ДМСО при концентрації в суспензії вище 5% призводить до достовірного підвищення рівня гемолізу ще на етапі інкубації. Незначна добавка ДМСО в середовище сахарози дозволяє істотно зменшити гемоліз еритроцитів при заморожуванні. Підвищення концентрації ПЕО-1500 дозволяє значно знизити рівень гемолізу еритроцитів на етапі заморожування-відігріву. Однак спостерігається різке зростання рівня гемолізу на етапі видалення кріопротектору.

У рамках дисертаційної роботи розроблено та запатентовано нове кріозахисне середовище з 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД і 5% сахарози, яке ефективно зберігає еритроцити бика, коня, кролика і людини в процесі кріоконсервування. Уперше показано, що після кріоконсервування у комбінованому кріозахисному середовищі осмотичні властивості еритроцитів ссавців кращі і при моделюванні трансфузії рівень їх гемолізу нижче, ніж з однокомпонентними середовищами.

Практичне значення отриманих результатів.

Отримані у дисертаційній роботі результати є підґрунтям для розробки технології низькотемпературного зберігання еритроцитів бика, коня і кролика з покращеним рівнем збереженості клітин в процесі кріоконсервування. Проведені наукові дослідження обґрунтовують доцільність використання комбінованих кріозахисних середовищ при кріоконсервуванні еритроцитів ссавців. Розроблене кріоконсервуюче середовище (15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2 ПД і 5% сахарози) має високу ефективність при кріоконсервуванні еритроцитів різних видів ссавців і є найбільш універсальним з досліджених на даний час кріозахисних розчинів. Підвищення температури склування суспензій еритроцитів бика,

коня, кролика і людини при кріоконсервуванні під захистом комбінованого кріозахисного середовища дозволяє розширити діапазон можливих температур зберігання крові, що полегшує практичне застосування розробленої методики кріоконсервування еритроцитів ссавців. Результати роботи можуть бути використані у курсі лекцій вищих навчальних закладів та як методичні вказівки в лабораторіях, які досліджують властивості еритроцитів після кріоконсервування.

Структура, обсяг і зміст дисертації.

Дисертаційна робота викладена на 141 сторінці друкованого тексту, з яких 102 сторінки – основного змісту. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, трьох розділів власних досліджень, узагальнення результатів, висновків, списку літератури. Список використаних джерел розміщений на 20 сторінках, включає 171 джерело, у тому числі 113 зарубіжних. Робота проілюстрована 33 рисунками (4 з них мікрофотографії) і 9 таблицями.

Анотація відповідає існуючим вимогам. У вступі обґрунтована актуальність роботи, вказано зв'язок з науковими програмами, визначено мету та завдання дослідження, наведено об'єкт, предмет та методи дослідження, визначені наукова новизна і практична значимість роботи, надані відомості щодо особистого внеску здобувача та апробації результатів.

Розділ «Огляд літератури» викладений на 20 сторінках і складається з двох підрозділів. В першому підрозділі на 11 сторінках висвітлено механізми кріопошкодження біологічних об'єктів та основні принципи кріоконсервування, описано типи існуючих кріопротекторів і механізми їх дії. У другому підрозділі зроблено докладний аналіз низькотемпературних фазових переходів у кріобіологічних системах та факторів, які впливають на їх розвиток. Обґрунтована доцільність вивчення низькотемпературних фазових переходів у комбінованих кріозахисних середовищах та визначення ефективності цих середовищ при кріоконсервуванні клітин.

У розділі «Матеріали і методи» наведені методики отримання експериментальних зразків крові, склад кріозахисних середовищ, режими охолодження, відігріву та відмивання еритроцитів; докладно описані метод ДСК та методики оцінки збереженості еритроцитів на різних етапах кріоконсервування. Відповідність методичних підходів не викликає сумнівів і зауважень. Слід підкреслити, що у роботі використано сучасне обладнання і методичні прийоми, що дозволило виконати дослідження на високому науковому рівні. Достовірність отриманих результатів підтверджується статистичною обробкою.

Власні дослідження викладені у трьох розділах. У першому розділі – «Низькотемпературні фазові переходи і склування у суспензіях еритроцитів ссавців в присутності кріозахисних сполук», визначені температури фазових переходів і склування в однокомпонентних і комбінованих захисних середовищах, а також у суспензіях еритроцитів з цими середовищами. Показано, що у всіх досліджених кріозахисних середовищах реєструється кристалізація на етапі нагріву, тобто при швидкому охолодженні утворюється нерівноважна аморфна фаза і швидкість нагрівання має вирішальне значення для того, щоб після розсклування у переохолодженої рідині не розпочалася кристалізація. Виявлено, що температура склування еритроцитів у комбінованих кріозахисних середовищах, які містять ПЕО-1500, ДМСО, 1,2-ПД і сахарозу, підвищується в порівнянні з температурою склування середовищ на основі ДМСО, що дозволяє розширити діапазон можливих температур зберігання еритроцитів.

Другий розділ власних досліджень «Збереженість еритроцитів на різних етапах кріоконсервування у присутності комбінованих кріозахисних середовищ» присвячено оцінці флуоресцентними методами ефективності комбінування проникального і непроникального кріопротекторів при кріоконсервуванні еритроцитів бика, коня і кролика. Виявлено, що при консервуванні еритроцитів коня і бика у комбінованому кріозахисному середовищі не тільки знижуються загальні втрати клітин у порівнянні з

розчином ДМСО, але й також еритроцити, які збереглися після всіх етапів кріоконсервування, більш близькі до контрольних. У розділі також проведено дослідження впливу складу кріоконсервуючого середовища на гемоліз еритроцитів ссавців на різних етапах кріоконсервування. Показано, що незначна добавка в комбіноване середовище сахарози дозволяє істотно зменшити рівень гемолізу еритроцитів при заморожуванні. Використання ДМСО при концентрації в суспензії вище 5% призводить до достовірного підвищення рівня гемолізу ще на етапі інкубації. Підвищення концентрації ПЕО-1500 дозволило значно знизити рівень гемолізу еритроцитів на етапі заморожування-відігріву. Однак спостерігається різке зростання рівня гемолізу на етапі видалення кріопротектору. Серед 10 досліджених комбінованих середовищ найбільший рівень збереженості еритроцитів був отриманий з комбінованим середовищем, що містить 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД і 5% сахарози.

У **третьому** розділі власних досліджень «Вплив кріоконсервування на осмотичні властивості еритроцитів ссавців» досліджено осмотичну крихкість еритроцитів на різних етапах кріоконсервування з розробленим комбінованим кріозахисним середовищем та проведено моделювання трансфузії деконсервованих еритроцитів. Показано високий рівень збереженості осмотичних властивостей еритроцитів ссавців при кріоконсервуванні у комбінованому середовищі і наведено його переваги на усіх етапах кріоконсервування у порівнянні з однокомпонентним середовищем на основі ДМСО.

Розділ «Узагальнення результатів» містить аналіз отриманих результатів, в стислій формі відображає суть роботи та її підсумки.

На основі проведених досліджень автор формулює сім висновків, які відповідають поставленим завданням і відображають сутність отриманих результатів.

Наприкінці наведено список використаних джерел та два додатки, які містять список публікацій здобувача та відомості про апробацію результатів дисертації.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За результатами отриманих у дослідженні даних опубліковано 20 наукових робіт: 2 статті у закордонних наукових журналах, 4 статті у наукових фахових журналах України (1 входить до міжнародної наукової бази Scopus), 2 статті у збірниках матеріалів конференцій, 1 патент України на корисну модель. Опубліковано 10 тез доповідей. Наукові праці повною мірою віддзеркалюють всі матеріали рецензованої дисертаційної роботи і автореферату.

При аналізі дисертаційної роботи виникли запитання для обговорення:

1. За результатами розділу 3 виявлено, що головний фактор, який вносить основний вклад у розвиток склування комбінованого кріозахисного розчину це сумарна концентрація кріопротектору. Чому ж у розділі 4 найменший рівень гемолізу у вас отримано не з середовищами з більшою концентрацією кріопротекторів, адже розвиток склоподібної фази повинен був захистити клітини найкраще?

2. У огляді літератури як один з можливих факторів, які пошкоджують клітини у процесі кріоконсервування, розглянуто рекристалізацію. А у результатах власних досліджень у вас з'являється термін кристалізація на етапі нагріву. Це одне й те саме фізичне явище? Чому використана різна термінологія?

3. Вам не вдалося оцінити дієвість однокомпонентного кріозахисного середовища на основі ПЕО-1500 з еритроцитами кролика через агрегацію еритроцитів. З чим, на вашу думку, це пов'язане?

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту і оформлення:

В тексті дисертації зустрічаються незначні стилістичні помилки та невдалі синтаксичні конструкції, які, однак не мають принципового значення і не знижують високої наукової і практичної цінності роботи.

Висновок. Дисертаційна робота Улізка Павла Юрійовича «Кріоконсервування еритроцитів ссавців із застосуванням комбінованих кріозахисних середовищ» є самостійною, завершеною науково-дослідною роботою, яка містить нове вирішення актуальної наукової проблеми в області експериментальної і прикладної кріобіології.

За актуальністю, новизною, обсягом проведених досліджень, обґрунтованістю наукових положень і висновків, а також за науковою та практичною значимістю дисертація відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року, які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Професор загальноузівської кафедри
фізичного виховання, спорту та здоров'я
людини Таврійського національного
університету імені В.І.Вернадського,
доктор медичних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України

[Signature]
А.С. Тимченко

Підпис професора Тимченко А.С. зовірено

Д.П.С.М., доцент, зав. загальноузівської
кафедри фізичного виховання,
спорту та здоров'я людини
ТНУ імені В.І. Вернадського



[Signature]
Дарювальська М.А.