

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Стріхи Оксани Анатоліївни «Вплив кріопротекторів і заморожування на електроізоляційні властивості цитоплазматичних мембран ооцитів і двоклітинних ембріонів миші», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

Дисертаційна робота Стріхи Оксани Анатоліївни спрямована на з'ясування важливих завдань кріобіології, а саме на дослідження явища електричного пробоя як одного з можливих факторів кріопошкодження цитоплазматичних мембран ооцитів і двоклітинних ембріонів миші при дії розчинів кріопротекторів та заморожування. Без сумніву проблема, що вивчається є актуальною для кріобіологічних досліджень.

У роботі використані сучасні теоретичні (фізико-математичні, комп'ютерне моделювання), експериментальні (імпульсна кондуктометрія, гормональна суперовуляція, оптична мікроскопія) методи дослідження і статистичної обробки отриманих результатів (параметричного аналізу), що надали можливість вирішити поставлені у дисертаційній роботі задачі і зробити коректні аргументовані висновки.

Застосування зазначених методів досліджень дозволило автору вперше отримати нові дані щодо змінення мембранного потенціалу, об'єму клітин, складу поза- і внутрішньоклітинного середовищ впродовж експозиції клітин у кріозахисному розчині та при їх заморожуванні, обґрунтувати можливість пошкодження клітин в процесі їх заморожування шляхом електричного пробоя клітинних мембран, а також експериментально встановити умови за яких відбувається електричний пробій двоклітинних ембріонів миші.

Практичне значення роботи полягає у тому, що дисертантом обґрунтовано механізм виникнення пори критичного радіуса при дії підвищеної напруженості поля, що може бути використано при розробці нових способів низькотемпературного консервування ембріонів ссавців.

Дисертаційна робота викладена на 132 сторінках. Вміщує 34 рис., 3 фото, 2 табл., 1 схему. Список використаних літературних джерел налічує 199 найменувань представлених на 21 сторінці.

У вступі відображені необхідні пункти, відповідно встановлених вимог. Дисертант переконливо обґрунтовує актуальність теми дисертації, акцентуючи увагу на суттєву роль порушення іонного і водного гомеостазу клітин, які відбуваються на різних етапах низькотемпературного консервування біологічних об'єктів та обумовлені зміною концентрацій поза- та внутрішньоклітинних іонів, і як наслідок, призводять до зміни мембранного потенціалу клітин.

Із об'єктивної обґрунтованості теми дисертації логічно витікають цілі та задачі дослідження.

В огляд літератури, який викладений на 25 сторінках, висвітлені всі питання, які розглядаються в основній частині роботи. Слід зазначити, що об'єм огляду літератури дещо перевищує рекомендований.

В огляді літератури дисертант докладно розглядає сучасні уявлення про закономірності процесу електропорації клітинних мембран при дії зовнішнього електричного поля на клітини, а також внаслідок електричного пробою мембран власним мембранним потенціалом. Ретельно аналізує основні підходи, які наразі використовуються для аналізу цього явища. Висвітлює дані, спираючись на які у подальших розділах дисертації будується фізико – математична модель електричного пробою клітин при кристалізації клітинної суспензії.

Другий розділ дисертації присвячений опису матеріалів та методів експериментальних досліджень. Позитивно сприяє аналізу роботи чітка і детальна схема проведення досліджень. Цей розділ вказує на володіння автором досить складними сучасними методиками, що добре підходять для вирішення задач, які ставляться перед дослідником. Для статистичної обробки експериментальних результатів було обрано адекватні методи статистичного аналізу. Методи відповідають задачам роботи.

Розділ 3 складається з 3 підрозділів і викладений на 57 сторінках.

У підрозділі 3.1 автор розглядає фізико-математичну модель трансмембранного переносу речовин та електропорації клітин при заморожуванні клітинної суспензії. Для конкретних розрахунків в якості моделі кріозахисного середовища дисертант використовував розчини диметилсульфоксиду та етиленгліколю. А в якості клітинних параметрів – транспортні та геометричні характеристики ооцитів і двоклітинних ембріонів миші. Встановлено, що при експозиції ооцитів і двоклітинних ембріонів миші в розчинах ЕГ і ДМСО спостерігається оборотна деполяризація мембран, тим більш виражена, чим вище концентрація кріопротекторів. Теоретичні розрахунки показали, що при повільному охолодженні ооцитів і двоклітинних ембріонів миші (<5 К/хв) після гіперполяризації мембран спостерігається їх деполяризація, в той час як при швидкому охолодженні мембранний потенціал досягає значень в інтервалі – 50÷–80 мВ, що може стати причиною електричного пробою мембран.

У підрозділі 3.2. дисертант моделює механізм виникнення у клітинній мембрані пори критичного радіуса при тому чи іншому режимі заморожування. У цьому підрозділі дисертант не тільки використовував існуючу на даний час кількісну модель електричного пробою біомембран, але і суттєво її удосконалив. У модифікованій моделі прийнято до уваги існування сил гідратаційного відштовхування між ліпідами, розташованими у стінці гідрофільної пори. Врахування цього ефекту призводить до зменшення значень мембранного потенціалу клітин, за яких відбувається порушення електроізоляційних властивостей їх цитоплазматичних мембран.

У підрозділі 3.3 теоретично розрахована величина напруженості електричного поля на мембранах клітин при заморожуванні. Вона досягає рівня (10^7 В/м), що перевищує експериментально встановлений критичний поріг напруженості поля (4×10^5 В/м), за якого відбувається порушення електроізоляційних властивостей цитоплазматичних мембран. Переконливо показано, що експозиція двоклітинних ембріонів в етиленгліколь-сахарозному середовищі упродовж 1,5 хвилин не призводить до необоротного електричного пробою та лізису бластомерів як до, так і після охолодження клітин до 77 К. Електроізоляційні властивості ембріонів порушуються після 3-хвилинної експозиції в етиленгліколь-сахарозному середовищі. Виявилось, що оборотна електропорація двоклітинних ембріонів реалізується в інтервалі напруженостей електричного поля $0,5-3 \times 10^5$ В/м, а необоротна електропорація при напруженостях поля більших $3,5 \times 10^5$ В/м.

В цілому представлена дисертаційна робота залишає позитивне враження, викладена гарною науковою мовою і оформлена відповідно існуючих вимог. В ній використані сучасні підходи і методи досліджень, отримано великий масив експериментальних результатів, що всебічно проаналізовані і обговорені. Висновки, представлені в роботі, відповідають поставленим завданням і отриманим результатам. Достовірність висновків забезпечується достатньою кількістю експериментів, статистичною обробкою результатів.

Основні результати роботи повністю наведені у 7 статтях, 5 з яких опубліковані дисертантом у вітчизняних наукових фахових виданнях, а також публічно обговорені на 12 міжнародних конференціях.

Зміст автореферату повністю відповідає основним положенням дисертації.

Роботу загалом оцінюю позитивно, проте необхідно вказати на певні недоліки та запитання:

1. В огляді літератури не наводяться дані щодо вибору саме таких клітин для дослідження (ооцитів і двоклітинних ембріонів миші) та кріопротекторів.
2. У зв'язку з тим, що робота присвячена можливості кріопошкодження клітин внаслідок порушення електроізоляційних властивостей їх цитоплазматичних мембран, дисертант, на мою думку, в огляді літератури приділив недостатньо уваги сучасним уявленням про пошкодження біологічних об'єктів в процесі фазового перетворення.
3. Як буде змінюватись об'єм та мембранний потенціал при заморожуванні клітин, які мають інше співвідношення поза- та внутрішньоклітинних іонів.
4. Занадто стисле викладення заключної частини дисертаційної роботи.
5. Незрозуміло, чи є запропонована автором модель універсальною?

Вищезазначені зауваження не змінюють загальної позитивної оцінки і наукової значимості дисертації.

За об'ємом і методичним рівнем досліджень, актуальністю, новизною, науковою та практичною значимістю робота Стріхи О. А. «Вплив кріопротекторів і заморожування на електроізоляційні властивості цитоплазматичних мембран ооцитів і двоклітинних ембріонів миші» відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань» ДАК України щодо кандидатських дисертацій. За поставленими завданнями і напрямком досліджень робота відповідає спеціальності 03.00.19 – кріобіологія, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за зазначеною спеціальністю.

Кандидат біологічних наук, доцент кафедри
хімії та біохімії ім. проф. О.В. Чечоткіна
Харківської державної зооветеринарної
академії МОН України

Підпис О.М. Денисової засвідчую:
Начальник відділу кадрів ХДЗВА


О. М. Денисова


І. М. Москаленко



Відзив

офіційного опонента на дисертацію Стріхи Оксани Анатоліївни
«Вплив кріопротекторів і заморожування на електроізоляційні властивості
цитоплазматичних мембран ооцитів і двоклітинних ембріонів миші» поданої на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності
03.00.19 – кріобіологія

Робота, яка виконана Стріхою О.А. відноситься до актуального напрямку сучасної кріобіології – з'ясуванню умов порушення електроізоляційних властивостей цитоплазматичних мембран (електричного пробою) ооцитів і двоклітинних ембріонів миші в процесі низькотемпературного консервування. Згідно з існуючими поглядами, в умовах низькотемпературного консервування можливе пошкодження клітинних мембран за умов електричного пробою, але систематично це питання не було досліджено та фізична модель цього процесу відсутня. У роботі експериментально досліджено електричну провідність ооцитів та ембріонів миші за умов охолодження в процесі кріоконсервування та зміни морфології мембран під час цього процесу. Але головна цінність роботи полягає у створенні теоретичної моделі електричного пробою мембран, яка добру узгоджується з експериментом та дає змогу істотно звужити область пошуку оптимальних умов кріоконсервування клітин. Таким чином, дослідження, які проводяться у даній роботі, є актуальними.

Дисертація побудована таким чином: «Вступ», розділ 1 «Сучасні уявлення про причини, механізми і закономірності електричного пробою біологічних мембран» у якому дано огляд літератури, розділ 2 «Матеріали та методи досліджень», розділ 3 «Результати власних досліджень та їх обговорення. Теоретичний аналіз і експериментальне моделювання електричного пробою клітин при кріоконсервуванні», «Висновок», де дано розгорнутий аналіз отриманих результатів та «Висновки», де коротко сформульовано основні результати роботи.

У розділі «Вступ» автор обґрунтовує актуальність роботи, демонструє зв'язок власних досліджень з роботами інших авторів та наводить всі необхідні дані про роботу, умови її виконання. об'єм досліджень та публікацій.

У розділі 1 автор наводить основні дані наукової літератури щодо експериментального дослідження електричного потенціалу клітинних мембран, умов електричного пробою клітинної мембрани та теоретичного аналізу причин виникнення електричного потенціалу клітинних мембран. Проаналізовані протиріччя у даних різних авторів. Розділ добре ілюстровано, наведено графіки

встановлених закономірностей, а також електронномікроскопічна фотографія наслідків електричного пробою клітинної мембрани.

У розділі 2 описані методи дослідження, які було використано у роботі. Описані методи фізико-математичного моделювання процесів трансмембранного переносу речовин при заморожуванні клітин, спосіб отримання двоклітинних ембріонів миші, метод кріоконсервування двоклітинних ембріонів миші, метод визначення електричної провідності двоклітинних ембріонів та інші методи.

У розділі 3, центральному у роботі, описані власні експериментальні результати автора. У розділі 3.1. «Фізико-математична модель трансмембранного переносу речовин і електропорації клітин при заморожуванні клітинної суспензії» розроблено фізико-математичну модель трансмембранного переносу речовин і електропорації клітин при заморожуванні клітинної суспензії. Дана теоретична модель виходить з припущення, що між зовнішньою і внутрішньою поверхнями мембрани створюється різниця електричного потенціалу і внутрішньомембранний електричний потенціал лінійно залежить від координати z в поперечному до її поверхні напрямку (гіпотеза постійного поля). Було отримано систему рівнянь, що описує ізотермічний трансмембранний перенос речовин, зміну об'єму клітин і мембранного потенціалу, виходячи з того, що основними за змістом компонентами позаклітинного і внутрішньоклітинного розчинів, поряд з не проникаючими через клітинні мембрани речовинами, є вода і кріопротектор, іони калію, натрію і хлору. Рішення системи рівнянь (3.1.17) - (3.1.19) описує шукані залежності об'єму, мембранного потенціалу клітин і складу внутрішньоклітинної і позаклітинної середовищ від часу на етапі ізотермічної експозиції клітин в кріозахисному розчині. При аналізі змін потенціалу мембран у процесі заморожування було враховано, що всі розчинені речовини і клітини витісняються кристалами льоду в рідку фазу. Завдяки кількісним параметрам, що були отримані раніше (наведені у таблиці 3.1.1.), було здійснено чисельне моделювання процесів перерозподілу речовин між ооцитами і двуклітинними ембріонами миші при їх ізотермічної експозиції в кріозахисному розчині і при заморожуванні. Між тим, створена кількісна модель масообміну між клітиною і навколишнім її середовищем є універсальною і може бути застосовна для аналізу процесів трансмембранного переносу речовин між клітинами і навколишнім їх середовищем в інших суспензіях клітин.

Завдяки створеній математичній моделі переносу речовин через клітинну мембрану було отримано цікаві дані, що характеризують зміни у часі об'єму клітин, які були розміщені у розчин кріопротектору. Так, оскільки проникність мембран клітин для молекул води набагато вище проникності для кріопротектору, в результаті зневоднення об'єм клітин спочатку зменшується. У міру проникнення кріопротектору всередину клітини одночасно в клітину надходить деяка частина води так, що концентрація кріопротектору поза- і всередині клітини залишається постійною в кожен момент часу. Об'єм клітини заодно починає збільшуватися і через 2-5 хвилин досягає первісного значення (рис. 3.1.4. та 3.1.5).

Дослідження кінетики змін електричного потенціалу показало, що мембранний потенціал ооцитів після переміщення в кріозахисний розчин швидко (за кілька секунд) змінюється від нормального значення (-20 мВ) до максимального значення +17,3 мВ в 3 М розчині, до +9,2 мВ в 2 М і до -2,4 мВ в 1 М розчині диметилсульфоксиду (ДМСО) (рис. 3.1.7). Аналогічна кінетика змін мембранного потенціалу характерна і для двоклітинних ембріонів (рис. 3.1.8). Аналогічний вигляд мають залежності від часу концентрацій іонів калію і хлору всередині клітини (рис. 3.1.9 і 3.1.10).

При вирішенні системи диференціальних рівнянь (3.1.20), (3.1.22) - (3.1.24), які описують процеси трансмембранного переносу речовин під час заморожування клітинної суспензії, видно, що збільшувати тривалість експозиції двуклеточний ембріонів миші понад 10 хвилин недоцільно, оскільки при більш тривалих часах експозиції вже не відбувається істотних змін ні в клітині, ні в кріозахисному середовищі (рис. 3.1.11. – 3.1.13).

Автор дослідила методом комп'ютерного моделювання рішення системи рівнянь (3.1.20), (3.1.22) - (3.1.24), які описують залежність зміна обсягу ооцита і бластомерів двуклеточний ембріона миші, внутрішньоклітинних концентрацій іонів і кріопротектори, мембранного потенціалу клітин і переохолодження їх цитоплазми в процесі охолодження з різними швидкостями і концентраціями кріопротекторів в кріозахисному розчині. На рис. 3.1.11 представлені залежності обсягу ооцита миші в процесі охолодження зі швидкостями 1, 5, 10, 100 К/хвилина у 1 М розчині етиленгліколю (ЕГ). В процесі охолодження зі швидкістю 100 К/хвилина відносний обсяг клітин залишається практично незмінним, в той час як при більш повільному охолодженні відбувається дегідратація клітин.

На рис. 3.1.14 - 3.1.16 представлені отримані методом комп'ютерного моделювання залежності мембранного потенціалу ооцитів і двоклітинних

ембріонів миші в процесі їх охолодження зі швидкостями 1; 5; 10 і 100 К/хвилина у 1 М розчинах диметилсульфоксиду та етиленгліколю в фізіологічному розчині. Як видно з рис 3.1.14 - 3.1.16, зі збільшенням швидкості охолодження спостерігається зростання негативного мембранного потенціалу (гіперполяризація).

У розділі 3.2. «Удосконалена модель електричного пробою клітинних мембран» створено модель процесу та проведено розрахунки залежності вільної енергії мембрани від розміру мембранної пори (рис. 3.2.1.). Розроблено теорію та дана оцінка часу, за який здійснюється розрив мембрани при заданому значенні мембранного потенціалу. При цьому, на відміну від попередніх досліджень в цієї галузі, було враховано гідратаційне відштовхування між головками ліпідів, що вистилають стінку мембранної пори. З урахуванням сили гідратаційного відштовхування розраховано залежність вільної енергії мембрани від радіуса гідрофільної мембранної пори. Розраховані чисельної оцінки залежності середнього часу утворення пори в клітинній мембрані від мембранного потенціалу наведено на рисунку 3.2.2. Також розраховано залежність середнього часу утворення пори в клітинній мембрані від прикладеної до неї мембранного потенціалу при трьох швидкостях охолодження двоклітинного ембріона миші з урахуванням сил гідратаційного відштовхування (рис. 3.2.3.).

Дуже важливим розділом роботи є розділ 3.3. «Експериментальне вивчення електричного пробою двоклітинних ембріонів миші до і після експозиції в кріозахисних розчинах і після повного циклу кріоконсервування методом вітрифікації». У цьому розділі проведено експериментальну перевірку тих теоретичних результатів, які були отримані у розділах 3.1 та 3.2. Зокрема, методом імпульсної кондуктометрії було вивчено вплив на електричну провідність двоклітинних ембріонів миші після експозиції клітин в кріозахисному середовищі і повного етапу кріоконсервування методом вітрифікації. На рис. 3.3.1 і 3.3.2 представлені експериментальні дані залежності питомої електричної провідності окремих двоклітинних ембріонів миші контрольної групи від напруженості електричного поля. Показано, що електропровідність ембріонів монотонно підвищується в міру збільшення амплітуди прямокутних імпульсів електричного поля. В цілому, така ж залежність спостерігається для електричної провідності двоклітинних ембріонів миші після півторахвилинної експозиції в середовищі вітрифікації (рисунки 3.3.3 – 3.3.4), для чого після 5-хвилинної експозиції в 10% -му розчині

етиленгліколю вони були експоновані в етиленгліколь-сахарозному середовищі (30% ЕГ + 0,7 М розчині сахарози). Проте спостерігається достовірне перевищення ($p \leq 0,05$) значень електричної провідності ембріонів (визначених при $0,5 \times 10^5$ В / м) що свідчить про рівномірну порацію плазматичних мембран ембріонів без порушення їх структурної цілісності. На рисунках 3.3.5 і 3.3.6 представлені залежності електричної провідності окремих ембріонів миші від напруженості електричного поля після їх трихвилинної експозиції в середовищі вітрифікації. Електропровідність ще зростає відносно попереднього варіанту та у діапазоні напруженостей $1,4-2 \times 10^5$ В/м на кривій провідності (рис. 3.3.6) з'являється ділянка з точкою перегину, характерної для злиття бластомерів. Також було досліджено інші модифікації середовища для кріоконсервування та електропровідність ембріонів після охолодження-відігріву (рис. 3.3.7 – 3.3.10). В цілому, збільшення часу експозиції від 1.5 до 3 хв призводить до зниження стійкості мембран ембріонів до дії прикладеного поля, що відбивається в явніці незворотного електричного пробою. Мабуть, збільшення електричної провідності плазматичних мембран після дії кріозахисних розчинів може бути наслідком зміни проникності мембрани для іонів і порушення іонного гомеостазу.

Оцінюючи роботу в цілому, треба відмітити, що у роботі отримані нові, експериментально обґрунтовані результати, які мають теоретичне та практичне значення. Разом з цим, можна відмітити окремі недоліки дисертації, які стосуються, перш за все, її оформлення.

1. Теоретичні результати отримані на ооцитах та двоклітинних ембріонах миші, експериментальні данні автор отримала тільки на моделі двоклітинних ембріонів.

2. На сторінці 29 є таке незрозуміле для мене та без всякого літературного посилання твердження: «показано, що глікокалікс підвищує, а натяг цитоскелету зменшує ймовірність електропорації мембрани еритроцита людини». Мабуть, автор хотіла сказати, що якісь зміни цих структур мають вказаний ефект.

3. На рисунку 3.1.1 (стор 54) практично неможливо побачити різницю між графіками А і В. Можливо, вони були відмічені різними кольорами, а треба було відрізнити підтриховкою.

4. В тексті дисертації є окремі синтаксичні помилки.

Відмічені недоліки не знижують загальної високої оцінки дисертації.

Таким чином, оцінюючи дисертаційну роботу Стріхі О.А. «Вплив кріопротекторів і заморожування на електроізоляційні властивості

цитоплазматичних мембран ооцитів і двоклітинних ембріонів миші» поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.19 – кріобіологія, можна зробити наступні висновки. Дисертаційна робота Стріхі О.А. виконана на високому методичному рівні. В роботі застосовано сучасні методи математичного моделювання, кріобіології та дослідження електричних властивостей клітин, а також методи статистичної обробки та інші методи. Зміст роботи відповідає спеціальності 03.00.19 – кріобіологія.

В роботі було отримано багато нових конкретних результатів, які мають наукове та прикладне значення. Отримані в роботі дані можуть бути використані у кріомедицині. У роботі отримані нові, експериментально обґрунтовані результати, висновки роботи достатньою обґрунтовані та повністю відображають зміст роботи. Представлена робота є завершеним науковим дослідженням та за своїм змістом, науковою новизною та практичною цінністю відповідає вимогам ДАК Міністерства освіти і науки, «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р., наказ № 567, а її автор - Стріха Оксана Анатоліївна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент,

зав. відділом генетики НДІ біології

Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна

доктор біологічних наук

Ю.Г. Шкорбатов Шкорбатов Ю.Г.

Підпис д.б.н. Ю.Г. Шкорбатова завірши

Анатолій Шкорбатов
Сергей

