

## **Відгук**

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Алі Сабіни Гульзарівни за темою**

**«Культивування та кріоконсервування клітин та мультиклітинних сфероїдів зі спінальних гангліїв неонатальних поросят»,** подану до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

### **Актуальність обраної теми дисертації.**

Представлена до мого розгляду дисертаційна робота присвячена дослідженню способів отримання культур клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят, вивченню їх морфофункціональних характеристик, та впливу кріоконсервування під захистом ДМСО на основні властивості моношарових та тривимірних культур.

Обрана тематика дослідження є актуальною та своєчасною, оскільки в останні роки культивування клітин *in vitro*, особливо у тривимірному форматі, користується високим попитом дослідників у галузях медицини, біології, біотехнології, онкології і особливо нейробіології. Перш за все, це пов'язано з тим, що тривимірні культури клітин зі спінальних гангліїв представляють собою вдалий модельний об'єкт для вивчення фундаментальних питань фізіології периферичної нервової системи, дослідження механізмів сенсорного сприйняття, аксонального транспорту, передачі нервового імпульсу, регенерації нервів. Вони можуть застосовуватися як цінне джерело прогеніторних клітин і нейротрофічних факторів для лікування нейродегенеративних захворювань, що є важливим для вирішення цілого ряду практичних завдань регенеративної медицини. Крім того, такі культури доцільно використовувати в якості тест-систем для вивчення механізмів захворювань нервової системи, пошуку нових способів нейропротекції, визначення ефективності або цитотоксичності фармакологічних сполук.

В процесі вирішення зазначених фундаментальних і практичних задач є недостатньо вирішеним питання щодо створення оптимальних способів довгострокового зберігання культури клітин зі спінальних гангліїв, при цьому кожний тип культури (2D- або 3D-формат) потребує індивідуального підходу. Слід зазначити, що дослідження чутливості клітин спінальних гангліїв до пошкоджуючих факторів кріоконсервування досі практично не проводилось. З огляду на це, дослідження впливу факторів кріоконсервування (складу кріозахисних середовищ, швидкостей охолодження і відігрівання тощо) на морфофункціональні властивості культури клітин зі спінальних гангліїв є своєчасними, актуальними, компенсують дефіцит інформації та сприяють вирішенню ряду фундаментальних, методичних, технічних і практичних питань сучасної науки.

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

Дисертаційна робота виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України 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, № державної реєстрації – 0116U003494).

**Наукова новизна отриманих результатів.**

Основні результати досліджень, одержані під час виконання дисертаційної роботи, безперечно характеризуються елементами наукової новизни. Насамперед слід зазначити, що вперше було здійснено комплексне вивчення оптимальних умов моношарового та тривимірного культивування, а також кріоконсервування клітин, отриманих зі спінальних гангліїв неонатальних поросят.

Вперше охарактеризовано основні морфологічні, імунофенотипові, проліферативні та міграційні властивості культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят.

Вперше проведено кріоконсервування культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді суспензії клітин та мультиклітинних сфероїдів, визначено їх стійкість до пошкоджуючих факторів кріоконсервування.

Вперше встановлено ефективні концентрації кріопротектора ДМСО для отримання істотної кількості життєздатних клітин, зокрема мантийних гліоцитів, та збереження співвідношення основних морфологічних типів клітин у культурі.

Вперше показано зв'язок між кількістю пасажів культури клітин зі спінальних гангліїв та стійкістю клітин до кріоконсервування. Виявлено, що кількість пасажів не лише впливає на морфологічну різноманітність клітинних типів культури, але й підвищує життєздатність клітин після розморожування.

З огляду на вищезазначені положення наукову новизну дисертаційної роботи можна вважати обґрунтованою та доведеною.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

В роботі, що представлена до захисту, вперше отримано культуру клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят як у вигляді класичної моношарової культури, так й мультиклітинних сфероїдів. Визначено оптимальний режим низькотемпературного зберігання цих культур, що, безперечно, має практичне значення для біології, медицини, біотехнології, ветеринарії і фармації. В рамках проведених досліджень розроблено методичні підходи та фактично відпрацьовано цикл «культивування-кріоконсервування-субкультивування» для отриманої культури, що дозволяє впровадити її в практику.

Вперше було вивчено здатність культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят до проліферації та диференціювання у 2D- та 3D- умовах, що є важливим для оцінки терапевтичної цінності культур цих типів для майбутнього практичного використання у лікуванні нейродегенеративних хвороб.

Вперше встановлено, що режим кріоконсервування, який включає три етапи (І етап – зі швидкістю  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$ ; ІІ етап – зі швидкістю  $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ ; ІІІ етап – занурення у рідкий азот) та використання кріозахисного середовища на основі 7,5% ДМСО, є оптимальним для кріоконсервування мантийних гліоцитів. Цей результат може бути використано у практиці кріоконсервування гліальних клітин периферичної нервової системи, отриманих з інших джерел.

Нові дані, одержані здобувачем при дослідженні процесів розвитку класичної моношарової культури та мультиклітинних сфероїдів зі спінальних гангліїв, а також їх чутливості до дії низьких температур, можуть бути включені до навчальної програми вищих навчальних закладів біологічного та медичного профілів.

### **Структура, обсяг і зміст дисертації.**

Дисертаційна робота побудована за класичним принципом та містить наступні розділи: анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, два розділи результатів власних досліджень, узагальнення результатів, висновки, перелік використаних джерел. Матеріали викладено на 156 сторінках, включаючи список використаної літератури – 262 джерела. Результати власних досліджень представлені детально, логічно та послідовно розташовані. Кожен розділ завершено коротким підсумковим узагальненням.

Дисертаційна робота ілюстрована 19 рисунками, 29 мікрофотографіями і таблицею, що дозволяє зробити підсумок про достовірність отриманих висновків та їх обґрунтованість.

Анотація дозволяє отримати загальне уявлення про дисертаційну роботу. Вона логічно та лаконічно представляє основні результати та наукові положення, що виносяться на захист.

Вступ розкриває стан обраної наукової проблеми, перспективи розвитку досліджуваного напрямку та його актуальність. У вступі визначено мету та завдання роботи, сформульовано об'єкт і предмет дослідження, визначені

наукова новизна і практичне значення одержаних результатів. Надано відомості про особистий внесок здобувача та апробацію матеріалів дисертації.

Розділ «Огляд літератури» складається з 6 підрозділів, в яких детально розглянуто структурно-функціональні особливості спінальних гангліїв, морфологічні та фенотипові властивості мантийних гліоцитів, проаналізовано різні підходи до культивування клітин чутливих гангліїв та висвітлено закономірності формування мультиклітинних сфероїдів. Особлива увага приділяється кріоконсервуванню культур нейральних клітин, як у вигляді суспензії, так і в складі мультиклітинних сфероїдів. Даний розділ дозволяє у повній мірі отримати інформацію, що стосується тематики дослідження.

У розділі «Матеріали і методи дослідження» наведено дані щодо використаних методів та дизайну експериментів на кожному етапі дослідження, а також щодо статистичної обробки одержаних результатів. Автор застосував сучасні методи дослідження, а саме: метод ферментативного виділення клітин зі спінальних гангліїв, моношарове (2D) і об'ємне (3D) культивування, кріоконсервування, імуноцитохімічний метод, світлову та флуоресцентну мікроскопію, морфометричний аналіз, методи статистичного аналізу. Аналізуючи методичні підходи можна зробити висновок, що дослідження проведено на високому науковому рівні.

Перший розділ власних досліджень містить дані щодо морфофункціональних і імунофенотипових властивостей культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят під час культивування у вигляді моношару або мультиклітинних сфероїдів. Автором було встановлено, що присутність у середовищі культивування фетальної телячої сироватки визначає основні морфологічні властивості культури. У середовищі з 10% сироватки утворюється моношарова культура, в той час як у присутності замінників сироватки B27 або Нейромакс – мультиклітинні сфероїди. При цьому клітинний склад моношару, який утворюється при культивуванні в присутності сироватки або після пересіву мультиклітинних сфероїдів, є подібним і містить 3 основних морфологічних типи клітин. Автор довів, що

час перебування в умовах культивування є критичним для збереження морфофункціональних властивостей мультиклітинних сфероїдів: після 20 діб культивування спостерігається зниження їх здатності до адгезії, пригнічення здібності клітин у їхньому складі до міграції і формування моношару.

Слід зазначити, що в роботі вперше охарактеризовано імунофенотиповий склад культури клітин, отриманої зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Встановлено, що клітини культури в основній масі експресують глутамінсинтетазу та  $\beta$ -III-тубулін, але не експресують S100.

У другому розділі власних досліджень представлено результати дослідження впливу кріоконсервування під захистом ДМСО на властивості культури клітин зі спінальних гангліїв, консервованої у вигляді клітинної суспензії або мультиклітинних сфероїдів.

За умов кріоконсервування культури у вигляді клітинної суспензії в середовищах, що містять ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, і з використанням трьохетапного режиму охолодження, було збережено життєздатність клітин на рівні 83-87%, вихід клітин на рівні 63-78% від контролю, а також характерні морфологічні типи клітин і експресію імунофенотипових маркерів. Автор також встановив, що кріоконсервування культури клітин у вигляді суспензії в кріозахисному середовищі з 7,5% ДМСО з використанням трьохетапного режиму охолодження дозволяє зберегти відносну кількість мантийних гліоцитів на рівні 94,5% від контролю.

Кріоконсервування культури у вигляді мультиклітинних сфероїдів у вищезазначених середовищах дозволило зберегти здатність мультиклітинних сфероїдів до адгезії, усі морфологічні типи клітин і експресію глутамінсинтетази та  $\beta$ -III-тубуліна, проте призводило до зниження на 22-25% здатності клітин сфероїдів до міграції та уповільнення на 50-65% швидкості формування моношару в порівнянні з контролем.

У розділі «Обговорення отриманих результатів» автором зроблено ретельний аналіз отриманих даних. Сформульовано 7 висновків, які в повній

мірі відображають отримані результати та відповідають поставленим завданням.

### **Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.**

Матеріали дисертації у повному обсязі викладені в 11 працях, із них – 4 статті в спеціалізованих виданнях України (2 – входять до міжнародної наукометричної бази Scopus), 1 стаття – у зарубіжному журналі, 6 публікацій – у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій. Матеріали дисертації відображені в авторефераті, який за структурою і змістом цілком відповідає тексту дисертації.

### **Зауваження та запитання щодо змісту та оформлення дисертаційної роботи та автореферату.**

Вважаю, що дисертаційна робота виконана на високому професійному та науковому рівні, оформлена якісно, гарно. Принципових зауважень до дисертації та автореферату немає. Трапляються поодинокі помилки в оформленні. Наприклад, в переліку використаної літератури зустрічаються розбіжності в оформленні бібліографічних посилань, як то скорочення цифрового ідентифікатора статей (DOI) в деяких випадках зазначається великими літерами, а в деяких – малими. Проте, загалом оформлення дисертаційної роботи та автореферату в повній мірі відповідає встановленим вимогам, а виявлені незначні недоліки не знижують цінності представленої на рецензування роботи.

В процесі рецензування виникли наступні запитання:

1. Автор встановив наявність у культурі клітин трьох морфологічних типів. Чи є вони різними за іншими характеристиками, наприклад, фенотипом, функцією, здібністю до міграції?

2. З чим Ви пов'язуєте факт зміни співвідношення морфологічних типів клітин у культурі після субкультивування та кріоконсервування?

## Висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота Алі Сабіни Гульзарівни за темою «Культивування та кріоконсервування клітин та мультиклітинних сфероїдів зі спінальних гангліїв неонатальних поросят» представляє собою цілісне наукове дослідження, в якому у повній мірі вирішено поставлені завдання. Дисертація за актуальністю, об'ємом, рівнем проведених досліджень, експериментальною обґрунтованістю висновків, науковою новизною та практичною значущістю повністю відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 № 567 (зі змінами) щодо кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Зав. лабораторії фармакології

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології

ім. В.Я. Данилевського НАМН України»,

доктор біологічних наук, професор



Малова Н. Г.