

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Шевченко Марії Володимирівни «Вплив гіпотермічного зберігання на поведінку ізольованих нервових клітин новонароджених щурів при культивуванні» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, представлену до захисту на засідання спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за фахом 03.00.19 – кріобіологія

Дослідження процесів проліферації, дозрівання, диференціювання та міграції нейральних стовбурових і прогеніторних клітин у головному мозку новонароджених має велике значення як для виявлення причин виникнення захворювань мозку в неонатальному періоді, так і для пошуку нових підходів лікування нейродегенеративних захворювань у дітей та дорослих.

Інтерес також становить вивчення впливу на дані процеси факторів клітинного мікрооточення, які представлені різного роду регуляторними чинниками, розчинними ростовими факторами і біологічно активними речовинами. Вивчення впливу тканинних екстрактів і сироватки крові, до складу яких входять паракринні та ендокринні фактори, котрі являються складовою частиною мікрооточення клітин, на поведінку нервових клітин в культурі, має безсумнівну актуальність і новизну. Крім того, представляє інтерес дослідження формування нервовими клітинами агрегатів, тривимірних структур, в яких відновлюється просторово-функціональна організація клітинного мікрооточення, і його вплив на виживання і функціонування клітин в культурі.

Широке використання клітин головного мозку новонароджених тварин як моделі для вивчення постнатального нейро- і гліогенезу та їхнього взаємозв'язку, розвитку апоптоза, механізму диференціювання стовбурових і прогеніторних клітин зумовлює необхідність їх повноцінного зберігання. Найчастіше клітини зберігають при температурі рідкого азоту, однак для

короткострокового зберігання більш доцільним є використання низьких позитивних температур. У зв'язку з цим виникає необхідність вивчення механізмів впливу низьких позитивних температур на клітини нервової тканини, що визначає актуальність дисертаційної роботи.

Наукове значення і новизна отриманих результатів дисертаційної роботи полягає в тому, що основні результати експериментальних досліджень отримані вперше, є новими та науково обґрунтованими.

Так, вперше були проведені порівняльні дослідження впливу середовищ внутрішньоклітинного та позаклітинного типу на ефективність гіпотермічного зберігання нервових клітин у складі суспензії та багатоклітинних агрегатів.

Показано, що середовище DMEM/F-12, що містить 10% сироватки крові та сахарозомісткий розчин забезпечують збереження популяцій диференційованих нервових клітин, а також нейральних стовбурових і прогеніторних клітин протягом 2 діб в умовах гіпотермії. Отримані оригінальні дані про те, що гіпотермічне зберігання нервових клітин у вигляді агрегатів дозволяє збільшити час зберігання клітин до 4 діб.

Були вперше встановлені мінімальні ефективні концентрації екстрактів мозку і печінки, при яких виявляється їх вплив на нервові клітини в умовах культури *in vitro*, а також виявлено, що додавання екстрактів мозку або печінки до середовища зберігання DMEM/F-12 дозволяє ефективно замінювати сироватку крові протягом 2 діб гіпотермічного зберігання клітин головного мозку новонароджених щурів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що проведені дослідження можуть бути основою для створення ефективних консервуючих розчинів для гіпотермічного зберігання ізолюваних нервових клітин, а також для з'ясування механізмів пошкодження клітин головного мозку в умовах холодової гіпоксії. Результати роботи можуть бути також використані при створенні протоколів культивування та гіпотермічного зберігання нервових клітин.

Дисертаційна робота викладена на 154 сторінках, складається зі вступу, огляду літератури, 1 розділу власних досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаної літератури. Робота добре проілюстрована, містить 50 рисунків та 9 таблиць. Список використаної літератури містить 224 найменування, викладений на 25 сторінках.

У вступі чітко сформульовані мета та задачі дослідження, наукова новизна та практичне значення отриманих результатів. Наведено вичерпне обґрунтування важливості та актуальності вибраного автором напрямку для проведення наукових досліджень.

В огляді літератури проведений кваліфікований аналіз даних, отриманих протягом останнього часу за темою дисертації. Автор критично розглядає надруковані за досліджуваною проблемою дані, результати яких є логічним обґрунтуванням актуальності та важливості роботи. Дисертантом розглянуті питання щодо характеристик і потенціального використання нейральних стовбурових клітин. Проаналізовано поведінку нервових клітин у культурі, роль мікрооточення в регуляції функціонування нейральних стовбурових клітин та вплив гіпотермічних умов зберігання на структурно-метаболичні характеристики клітин і тканин. Розділ написано гарною літературною мовою, легко читається.

У розділі «Матеріали і методи дослідження» представлені досить складні та трудомісткі сучасні методи кріобіології та клітинної біології, а саме: культивування, імуноцитохімія, спектрофотометрія, гель-проникна хроматографія, світлова та флуоресцентна мікроскопія, морфометричний аналіз, методи статистичного аналізу. Використані методи відповідають задачам роботи.

Розділ «Результати власних досліджень та їх обговорення» складається з 4 підрозділів, викладений на 79 сторінках.

У підрозділі 3.1 автор розглядає вплив фетальної сироватки телят і сироватки крові дорослих щурів при культивуванні нервових клітин новонароджених щурів. Встановлено, що введення сироватки крові дорослих

щурів до середовища культивування забезпечує клітинам головного мозку новонароджених щурів умови більш повної реалізації їхніх властивостей порівняно з застосуванням фетальної сироватки телят, а саме: прискорює прикріплення утворених клітинних агрегатів, сприяє формуванню більш щільного моношару, забезпечує більш ранню появу нейробластоподібних клітин, здатних до експресії β -тубуліна III та здатність до формування на моношарі колоній нестин- і віментин-позитивних клітин.

У підрозділі 3.2 дисертант визначає вплив екстрактів мозку і печінки неонатальних щурів на поведінку нервових клітин новонароджених щурів в культурі. Автором проведено дослідження молекулярно-масового розподілу пептидів в екстрактах тканин щурів залежно від стадії їх розвитку та встановлені мінімальні ефективні концентрації екстрактів мозку та печінки неонатальних щурів, при яких виявляється їх вплив на нервові клітини в умовах культури *in vitro*. А саме показано, що екстракти тканин мозку і печінки щурів різного віку містять речовини пептидної та білкової природи з молекулярною масою $550 \div 12000$ Да. Із збільшенням віку тварин в екстрактах зростає кількість білків і зменшується кількість пептидів. Додавання до середовища культивування нервових клітин екстракту мозку новонароджених щурів у концентрації 0,3 мг білка/мл прискорює формування конфлюентного моношару і появу на ньому β -тубулін III-позитивних нейробластів і колоній недиференційованих нестин/віментин-позитивних клітин. Присутність екстракту в концентрації 0,3 мг білка/мл у середовищі культивування нервових клітин пригнічує формування моношару і появу на ньому β -тубулін III-позитивних клітин, та колоній нестин- і віментин-позитивних клітин.

У підрозділі 3.3 представлені результати оцінки ефективності гіпотермічного зберігання суспензії клітин головного мозку новонароджених щурів у середовищі DMEM/F-12 і в сахарозомісткому розчині. Було показано, що середовище DMEM/F-12, що містить 10% сироватки крові і сахарозомісткий розчин без сироватки забезпечують збереження

диференційованих нервових клітин, а також нейральних стовбурових і прогеніторних клітин протягом 2 діб в умовах гіпотермії. При цьому додавання екстракту печінки або мозку до середовища зберігання DMEM/F-12 у концентрації 0,3 мг білка/мл дозволяє ефективно замінювати сироватку крові протягом 2 діб гіпотермічного зберігання нервових клітин.

У підрозділі 3.4 представлені результати дослідження ролі формування багатоклітинних агрегатів на ефективність гіпотермічного зберігання нервових клітин. Було встановлено, що гіпотермічне зберігання нервових клітин у вигляді агрегатів дозволяє збільшити строк їх ефективного зберігання до 4 діб. Клітини при цьому зберігають здатність формувати моношар, на якому з'являються β -тубулін III-позитивні нейробластоподібні клітини і колонії недиференційованих нестин/віментин-позитивних клітин.

В заключному розділі проведено аналіз та узагальнення результатів дослідження. Висновки повністю відповідають поставленим у роботі завданням та логічно впливають з фактичного матеріалу.

Основні результати за матеріалами дисертації наведені у 17 друкованих роботах, серед них 5 статей у наукових фахових журналах і 12 тез доповідей на міжнародних та національних наукових конференціях.

Автореферат дисертації повністю відповідає основному змісту і дає повне уявлення про наукову цінність і практичне значення роботи.

В цілому дисертаційна робота М.В. Шевченко виконана на відповідному науковому рівні. Викладення матеріалу вказує на належну професійну підготовку дисертанта у питаннях, що винесені для розгляду. Робота заслуговує позитивної оцінки, але необхідно вказати на окремі недоліки, а саме:

1. Чим обумовлені значні відмінності життєздатності клітин первинної культури? Чи є обґрунтованим використання в експериментах клітин, вихідна життєздатність яких складає 30%?

2. Немає інформації щодо критеріїв вибору концентрацій досліджуваних сироваток та екстрактів тканин.

3. Незрозуміло, в якій мірі сироватка крові та екстракти тканин мозку і печінки відповідають поняттю «мікрооточення» клітин головного мозку новонароджених щурів.

4. Не зовсім зрозумілим є механізм негативного впливу екстракту печінки на нервові клітини новонароджених щурів при культивуванні.

Вище перелічені недоліки проте не знижують загальної високої оцінки дисертаційної роботи.

За актуальністю, поставленими завданнями, новизною, практичним значенням і напрямком досліджень робота Шевченко М.В. «Вплив гіпотермічного зберігання на поведінку ізолюваних нервових клітин новонароджених щурів при культивуванні» відповідає профілю спеціалізованої вченої ради при ІПКіК НАН України та вимогам ДАК України щодо кандидатських дисертацій (п. 11 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань»), а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – «кріобіологія».

Офіційний опонент,

завідувач кафедри хімії та біохімії

Харківської державної зооветеринарної академії

МАН України

доктор біологічних наук, професор

Жегунов Г.Ф.

Підпис д.б.н. Г.Ф. Жегунова засвідчую:

нач. відділу кадрів



І.М. Москаленко

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Шевченко Марії Володимирівни «Вплив гіпотермічного зберігання на поведінку ізольованих нервових клітин новонароджених щурів при культивуванні», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

Робота є актуальною, оскільки важливим являється розробка методів оптимального зберігання різних популяцій нейральних клітин, які можуть використовуватися в медико-біологічних дослідженнях і потенційно у клітинній терапії. Гіпотермічне зберігання клітин може позитивно впливати на синхронізацію клітинного циклу, зменшити енергозатрати клітин та дозволить подовжити інтервал часу для проведення діагностичних методів, включаючи цитогенетичні дослідження та оцінку життєздатності різних клітинних популяцій, в тому разі стовбурових, прогеніторних, нейрональних і гліальних клітин у відповідності до міжнародних протоколів. Оптимізація гіпотермічних умов зберігання нейроклітин дійсно може бути альтернативою кріоконсервації.

Дисертаційна робота Шевченко М.В. присвячена важливій фундаментальній проблемі вивчення поведінки ізольованих нейроклітин при їх зберіганні та культивуванні.

Мета роботи – «визначення впливу гіпотермічного зберігання на стан і поведінку в культурі клітин головного мозку новонароджених щурів в залежності від умов мікрооточення», чітко сформульована дисертантом і включає вирішення фундаментальних питань впливу факторів мікрооточення на поведінку нейроклітин при гіпотермічному зберіганні та культивуванні, а також має практичний аспект, а саме при розробці протоколів умов зберігання та культивування нейроклітин.

У роботі сформульований комплекс задач, які охоплюють дослідження по вивченню впливу сироватки та екстрактів тканин на поведінку

неонатальних нейральних клітин в культурі, а також автор ставить перед собою задачу дослідження ефективності гіпотермічного зберігання нейроклітин різного ступеня диференціювання в залежності від складу середовища зберігання і при зберіганні клітин у складі агрегатів. Автор переконливо демонструє актуальність вивчення впливу факторів клітинного мікрооточення на поведінку стовбурових і прогеніторних нейроклітин в культурі *in vitro* для виявлення закономірностей постнатального нейрогенезу. Автором запропонований метод зберігання нервових клітин у складі агрегатів, в яких дійсно відбувається селекція життєздатних клітин та створюються умови для виживання внаслідок відновлення клітинного мікрооточення, подібного *in vivo*. Протекторними механізмами даної маніпуляції можуть виступати синхронізація фаз клітинного циклу і селективний відбір життєздатних клітин.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані для виявлення механізмів пошкодження ізольованих клітин головного мозку в умовах холодової гіпоксії. Проведені дослідження можуть бути основою для створення ефективних консервуючих розчинів для гіпотермічного зберігання ізольованих нервових клітин.

В роботі показаний вплив середовища культивування та присутність в ньому сироватки на поведінку нервових клітин тварин раннього постнатального періоду в культурі.

Виявлено, що сироватка крові дорослих щурів, а також екстракт мозку неонатальних щурів у концентрації 0,3 мг білка/мл спричиняють позитивний вплив на формування моношару і появу в культурі нейробластоподібних клітин, здатних до експресії β -тубуліна III і колоній недиференційованих нестин- і віменин-позитивних клітин.

У порівняльному аспекті показано, що гіпотермічне зберігання нервових клітин у складі агрегатів збільшує збереженість клітин та термін їхнього ефективного зберігання до 4 діб.

Автором самостійно проведені всі фрагменти наукової роботи. Апробація результатів дисертації здійснювалася на вітчизняних і міжнародних конференціях та з'їздах. Дисертація викладена на 154 сторінках, ілюстрована 9 таблицями і 50 рисунками, на яких можна візуалізувати отримані результати.

Для вирішення всього комплексу поставлених задач була використана достатня кількість сучасних методологій досліджень, а саме культивування клітин, імуноцитохімічний метод, спектрофотометрія, гель-проникна хроматографія, МТТ-метод (відновлення оксидоредуктазними ферментами метилтіазолілдіфеніл-тетразоліум броміду в формазан), світлова та флуоресцентна мікроскопія, морфометричний аналіз. В роботі використовувалися адекватні методи статистичного аналізу.

Огляд літератури дисертації свідчить про широту і глибину ерудиції автора в області клітинної біології. В огляді літератури представлені розділи, які включають загальні відомості про стовбурові нейральні клітини та закономірності їх диференціювання при культивуванні, ролі факторів мікрооточення в регуляції функціонування клітин, а також формування нових метаболічних характеристик при гіпотермічних умовах зберігання.

Розділ 3 «Результати власних досліджень та їх обговорення» представлений 4 підрозділами.

Підрозділ 3.1 присвячений дослідженню впливу фетальної сироватки телят і сироватки крові дорослих щурів на поведінку нервових клітин новонароджених щурів в культурі. На фотографіях представлені агрегати, які формують нервові клітини. Присутність сироватки крові дорослих щурів у середовищі культивування призводила до компактизації клітинних агрегатів протягом 1-ї доби культивування. Клітин прикріплених до підложки агрегатів формували β -тубулін III-позитивні відростки, представлені на фото (рис. 3.1.7). На рис. 3.1.10 представлені β -тубулін III-позитивні клітини з морфологією нейронів в культурі клітин головного мозку при використанні фазового контрасту і флуоресценції. На рис. 3.1.14 і 3.1.15 можна розрізнити

відростки і контакти, що формуються між колоніями нейральних стовбурових/прогеніторних клітин у культурі клітин головного мозку, які культивували у присутності сироватки крові дорослих щурів.

У підрозділі 3.2 описані ефекти впливу екстрактів мозку і печінки неонатальних щурів на поведінку нервових клітин новонароджених щурів в культурі. Проведено дослідження молекулярно-масового розподілу речовин пептидної і білкової природи в екстрактах тканин мозку і печінки щурів різних стадій розвитку. На рис. 3.2.1 видні виражені відмінності вмісту пептидних і білкових фракцій даних тканин. Максимальний репертуар пептидних фракцій виявлений в екстрактах мозку ембріонів і новонароджених щурів. Автор вважає, що регуляторні пептиди у складі екстракту мозку новонароджених щурів впливають на поведінку клітин головного мозку новонароджених щурів в культурі. Показано, що додавання екстракту мозку в концентрації 0,3 мг білка/мл до середовища культивування нервових клітин прискорює формування моношару і появу на ньому β -тубулін III-позитивних нейробластів і колоній недиференційованих нестин- і віментин-позитивних клітин. Присутність екстракту печінки в концентрації 0,3 мг білка/мл спричиняє негативний вплив на формування моношару та появу на ньому клітин, що експресують β -тубулін III, а також колоній нестин- і віментин-позитивних клітин.

Підрозділ 3.3 присвячений дослідженню гіпотермічного зберігання первинної суспензії нервових клітин новонароджених щурів у середовищах внутрішньоклітинного та позаклітинного типу у присутності та за відсутності екстрактів мозку і печінки неонатальних щурів. Показано, що при гіпотермічному зберіганні первинної суспензії клітин головного мозку, незалежно від середовища зберігання і присутності в ньому сироватки крові або екстрактів мозку та печінки, спостерігається поступове зниження показників їхньої збереженості та метаболічної активності. При цьому гіпотермічне зберігання до 2 діб у середовищі DMEM/F-12 у присутності сироватки крові або в сахарозомісткому розчині без сироватки не призводить

до змін поведінки клітин при культивуванні у порівнянні з культурою свіжовиділених клітин (відбувається формування багатоклітинних агрегатів, прикріплення їх до підложки, міграція клітин і формування моношару, на якому виявляються β -тубулін III-позитивні клітини і колонії нестин- і віментин-позитивних клітин). Екстракт мозку та екстракт печінки в концентрації 0,3 мг білка/мл, подібно сироватці, сприяють виживанню нервових клітин при гіпотермічному зберіганні у середовищі DMEM/F-12.

У підрозділі 3.4 проведено дослідження ролі формування багатоклітинних агрегатів на ефективність гіпотермічного зберігання диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин. Автором показано, що гіпотермічне зберігання нервових клітин у вигляді агрегатів дозволяє збільшити термін зберігання клітин до 4 діб: незалежно від присутності у середовищі DMEM/F-12 сироватки і в сахарозомісткому розчині без сироватки клітини зберігають здатність формувати моношар, на якому з'являються β -тубулін III-позитивні нейробласти і колонії недиференційованих нестин- і віментин-позитивних клітин.

Необхідно відзначити, що поставлені задачі вирішені у повній мірі та отримані достовірні результати, які підтверджені публікаціями. Робота виконана на сучасному рівні. Наведені в роботі результати досліджень багаторазово обговорюються, а зроблені висновки є логічними. Висновки і висунуті положення характеризуються науковою новизною та мають теоретичне і практичне значення.

Результати досліджень пройшли апробацію на авторитетних вітчизняних та зарубіжних наукових конференціях. В цілому рівень і кількість публікацій та апробації матеріалів дисертації на конференціях повністю відповідають вимогам ДАК України.

При рецензуванні роботи по тексту відзначені найбільш вагомі моменти, на які слід звернути увагу в презентації при поданні положень, що виносяться до захисту. В цілому до дисертаційної роботи у мене немає принципових зауважень.

Однак дисертанту слід звернути увагу на наступні зауваження та запитання:

1. На сторінці 59 автор характеризує відмінності спектра білкових патернів екстрактів печінки і мозку щурів і стверджує, що екстракти печінки характеризувалися більш високим вмістом білкових фракцій. Зрозумілий сенс цього твердження, проте формулювання є неточним, його необхідно виправити.

2. У розділі 3.3 описані ефекти гіпотермічного зберігання нейральних клітин. За допомогою МТТ-тесту показано, що зберігання у середовищі DMEM/F-12 супроводжувалося зниженням інтенсивності утворення формазану. Хотілося б бачити опис передбачуваних механізмів з погляду відновлювальних процесів.

3. Які компоненти сироватки крові можуть чинити позитивний вплив на виживання клітин і до якого класу речовин їх можна віднести?

4. Який механізм утворення клітинних агрегатів і яке біологічне значення клітинної агрегації? Чи спостерігали ви які-небудь екзометаболіти навколо агрегатів?

5. Які компоненти середовища DMEM/F-12 подібні до позаклітинного середовища організму?

6. Чому Ви вважаєте, що сироватка крові, якою збагачувалося середовище для гіпотермічного зберігання клітин, являється фактором, який забезпечує тільки осмотичний тиск колоїдів (стор. 85)?

Вищевикладені зауваження не знижують загальної позитивної оцінки роботи. Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, сформульованих в роботі Шевченко М.В., є достатнім, базується на аналізі літературних джерел за даною проблемою і на чітко сформульованій меті та задачах дослідження, а також на використанні сучасних методологій наукового пошуку, обговоренні отриманих результатів і чіткому формулюванні висновків.

Вважаю, що дисертаційна робота Шевченко Марії Володимирівни «Вплив гіпотермічного зберігання на поведінку ізольованих нервових клітин новонароджених щурів при культивуванні» відповідає вимогам п.п. 11, 13, 14 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
завідувач діагностичної лабораторії з
імуноферментним та
імунофлюоресцентним аналізом
ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії
імені В.Т. Зайцева» НАМН України



Клімова О.М.

Підпис д.б.н., проф. О.М. Клімової засвідчую:

*Вр. секретар ДУ, ІСМХ ім. В.Т. Зайцева
НАМНУ "Зайченко О.В. Зайченко"*