

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

Той факт, що вивчення стовбурових та прогеніторних клітин сьогодні набуває все більшої популярності, не викликає сумнівів. Нікого не дивує і той момент, що досить велику увагу дослідники приділяють ембріональним стовбуровим клітинам, адже від ступеня зрілості безпосередньо залежить їх проліферативний потенціал. Так, наприклад, розвиток нервової системи під час ембріонального розвитку вивчено достатньо добре. В той же час існує несправедливо мало інформації стосовно процесів нейро- та гліогенезу у постнатальному періоді, а також механізмів функціонування нервових стовбурових клітин та клітин-попередників у стовбурових нішах неонатального мозку. Моделлю для таких досліджень можуть виступати клітини головного мозку новонароджених щурів. Результати таких експериментів можна буде використовувати для подальшого з'ясування причин виникнення нейродегенеративних захворювань та обґрунтування використання нервових стовбурових клітин для лікування патологій центральної нервової системи. Не менш актуальним питанням при дослідженні потенціалу нервових клітин є розробка адекватних методів їх зберігання з метою подальшого використання. У цьому плані перспективним може бути гіпотермічне зберігання. До того ж, результати вивчення впливу низьких позитивних температур на клітини нервової тканини можуть бути корисними не тільки для розробки ефективного способу їх зберігання, але й

для з'ясування механізмів позитивної дії гіпотермії у медицині при лікуванні патологій, викликаних гіпоксією та травмами у новонароджених.

Використання сучасних методів кріобіології та клітинної біології дозволило дисертанту вперше отримати дані щодо ефективності гіпотермічного зберігання нервових клітин новонароджених щурів у складі суспензії та багатоклітинних агрегатів у середовищах внутрішньоклітинного та позаклітинного типу, а також дослідити особливості поведінки нервових клітин в культурі при збагаченні середовища культивування сироваткою крові або екстрактами тканин мозку та печінки новонароджених щурів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що були отримані дані про можливість використання середовища DMEM/F-12, збагаченого 10% сироватки крові або сахарозомісткого розчину без добавок для ефективного зберігання суспензії нервових клітин у гіпотермічних умовах протягом 2 діб. Гіпотермічне зберігання нервових клітин у складі агрегатів збільшує строк зберігання диференційованих, стовбурових і прогеніторних нейральних клітин до 4 діб. Отримані результати можуть бути використані при створенні протоколів культивування та гіпотермічного зберігання нервових клітин.

Побудова дисертації є традиційною, має всі необхідні складові частини, викладена на 154 сторінках друкарського тексту, складається зі вступу, огляду літератури, розділу власних досліджень та їх обговорення, висновків і списку використаної літератури. Робота ілюстрована 9 таблицями і 50 рисунками. Список використаної літератури налічує 224 найменування, представлених на 25 сторінках.

У вступі чітко сформульовані мета та задачі дослідження, переконливо обґрунтована актуальність теми дисертації, її наукова новизна, а також практичне значення отриманих результатів.

В огляді літератури наводяться основні дані щодо характеристик, властивостей і потенціального використання нейральних клітин різного ступеня зрілості, методик культивування нервових клітин, ролі клітинного

мікрооточення в регуляції функціонування нейральних стовбурових клітин, а також вплив гіпотермічних умов зберігання на структурно-метаболичні характеристики клітин і тканин.

В розділі «Матеріали та методи дослідження» описані методи дослідження, які були використані в роботі, а саме: культивування, імуноцитохімія, спектрофотометрія, гель-проникна хроматографія, світлова та флуоресцентна мікроскопія, морфометричний аналіз, методи статистичного аналізу.

Розділ «Результати власних досліджень та їх обговорення» складається з 4 підрозділів.

У підрозділі 3.1 автором досліджений вплив фетальної сироватки телят і сироватки крові дорослих щурів при культивуванні нервових клітин новонароджених щурів. Було встановлено, що уведення алогенної сироватки крові дорослих щурів у середовище культивування DMEM/F-12 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 на 2 доби, 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 дисертантом досліджувався вплив екстрактів мозку і печінки неонатальних щурів на поведінку нервових клітин новонароджених щурів в культурі. Було проведено дослідження молекулярно-масового розподілу пептидів в екстрактах тканин щурів залежно від стадії їх розвитку. Показано, що екстракти мозку і печінки щурів різного віку містять речовини пептидної та білкової природи з молекулярною масою $550 \div 12000$ Да, при цьому із збільшенням віку тварин в екстрактах зростає кількість білків і зменшується кількість пептидів. Позитивний вплив екстракту мозку на поведінку нервових клітин в культурі автор пов'язує з присутністю ньому

регуляторних чинників пептидної природи. Негативний вплив екстракту печінки на клітини мозку новонароджених щурів свідчить, на думку автора, про тканинспецифічність дії екстракту, оснований на присутності речовин, не характерних для нервової тканини головного мозку.

У підрозділі 3.3 наведено результати дослідження гіпотермічного зберігання первинної суспензії нервових клітин новонароджених щурів. Показано, що 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 головного мозку: спостерігається 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. При цьому додавання екстрактів мозку або печінки неонатальних щурів у концентрації 0,3 мг білка/мл до середовища DMEM/F-12 при гіпотермічному зберіганні первинної суспензії клітин головного мозку новонароджених щурів забезпечує збереження диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин протягом 2 діб.

У підрозділі 3.4 дисертант наводить результати дослідження гіпотермічного зберігання нервових клітин новонароджених щурів у складі агрегатів. В роботі показано, що гіпотермічне зберігання клітин головного мозку новонароджених щурів у вигляді багатоклітинних агрегатів у середовищі DMEM/F-12, незалежно від присутності сироватки крові, або в сахарозомісткому розчині без сироватки подовжує час ефективного збереження диференційованих і стовбурових/прогеніторних нейральних клітин до 4 діб. Автор припускає, що в агрегатах відновлюється мікрооточення, що забезпечує клітини необхідними для їх виживання паракринними та ендокринними факторами. Крім цього, на думку автора, в процесі формування агрегатів може відбуватися утворення втрачених компонентів позаклітинного матриксу, що має позитивний вплив на

виживання нервових клітин в умовах гіпотермії і дозволяє збільшити строк їх гіпотермічного зберігання.

Робота виконана із залученням сучасних методів дослідження на високому методичному рівні, що дозволило автору вирішити всі поставлені в дисертації задачі. Обсяг проведених досліджень та отриманих експериментальних даних цілком достатній для кандидатської дисертації. Висновки логічно випливають із результатів власних досліджень і повністю відповідають сформульованим задачам. Автореферат дисертації відображає структуру дисертації та її основний зміст.

Результати дисертаційної роботи викладені у 17 друкованих роботах, з них 5 – у наукових спеціалізованих виданнях, 12 – у збірниках тез наукових робіт і доповідей на наукових конференціях.

В цілому дисертаційна робота М.В. Шевченко заслуговує позитивної оцінки, проте є окремі зауваження:

1. При дослідженні впливу сироватки крові дорослих щурів при культивуванні нервових клітин відзначається поява нейральних стовбурових клітин та ранніх клітин-попередників за допомогою маркерів нестину та віментину. Але здається, що на фотографіях у обох випадках це одні й ті самі клітини. Прокоментуйте будь-ласка.

2. Викликає питання етап хроматографічного дослідження екстрактів. Чи не доцільніше було провести цю частину експерименту перш ніж вивчати вплив вже конкретних екстрактів. І чому спектр досліджуваних екстрактів більш широкий, ніж в самій роботі? Якою була мета даної роботи? Незрозуміло, тому що в кінці розділу зроблено загально біологічний та на мій погляд відомий висновок.

3. У результаті експериментів з гіпотермічного зберігання суспензії клітин та при додаванні екстрактів мозку та печінки, здається, отримали однакові результати. Висновок 4 та 5 по суті не відрізняються. Ймовірно автор мав на увазі не подовження строків зберігання та покращення стану клітин після зберігання з додаванням екстрактів, а те, що вони виступили

компонентом, що замінив сироватку крові щурів у попередніх експериментах.

Підсумовуючи все вищевикладене, слід зазначити, що за поставленими завданнями і напрямком досліджень дисертаційна робота точно відповідає спеціальності 03.00.19 – кріобіологія.

За актуальністю, новизною, науковою та практичною значимістю, обсягом і методичним рівнем досліджень робота Шевченко М.В «Вплив гіпотермічного зберігання на поведінку ізольованих нервових клітин новонароджених щурів при культивуванні» відповідає вимогам ДАК України до 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,

старший науковий співробітник

доцент кафедри молекулярної та медичної біофізики

Харківського національного університету ім. В.П. Каразіна

кандидат біологічних наук



Сосімчик І.О.

Підпис к.б.н. І.О. Сосімчик засвідчую: