

Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Новикової Оксани Юріївни за темою «Морфофункціональні властивості кріоконсервованих похідних нервового гребеня, отриманих з різних джерел», 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 дисертаційна робота Новикової О.Ю. присвячена вивченню культур клітин, отриманих з наднирників та волосяних фолікулів різних тварин. Вивчається вплив різних поживних середовищ культивування на характеристики отриманих культур, а також можливість збереження цих властивостей після кріоконсервування.

Проблема пошуку нових типів неспеціалізованих клітин в дорослому організмі є сучасною та актуальною як в теоретичному плані, так і з огляду їх терапевтичного потенціалу. Сучасним підходом є культивування у вигляді тривимірних культур – мультиклітинних сфероїдів. Структура мультиклітинного сфероїда дозволяє імітувати умови, в яких клітини знаходяться в організмі – в оточенні інших клітин та міжклітинного матриксу.

Досліджені культури з наднирників та дермальних папіл мають спільні особливості, такі як спільне онтогенетичне походження з нервового гребеня, збереження некомпітованого стану в постнатальному онтогенезі та здатність до спеціалізації в декілька типів клітин. Перелічені особливості роблять цікавою та актуальною задачу порівняння даних типів клітин та їхніх культур при культивуванні *in vitro*.

Кріоконсервування є методом, що дозволяє зберегти різноманітні типи клітин для тривалого дослідження, проте вплив кріоконсервування на

здатність формувати 3D-структури та збереження характеристик клітин в їх складі є досить новою галуззю досліджень та потребує вивчення. Важливо продемонструвати, що кріоконсервування дозволяє зберегти їх життєздатність, мікроструктуру клітин, проліферативні характеристики, експресію молекулярно-фенотипічних маркерів, потенціал до диференціювання. Вивчення даних характеристик в нативній та кріоконсервованій культурі, проводить автор в дисертаційній роботі.

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

Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в межах науково-дослідної теми «Властивості кріоконсервованих 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.

Результати, отримані в роботі Новікової О.Ю., безумовно, мають елементи наукової новизни. Оскільки вперше отримана та охарактеризована культура з клітин зони росту волосяного фолікула вібриси неонатальних кроликів у вигляді моношару та сфероїдів. Встановлено здатність культури до тривалого субкультивування зі збереженням здатності до формування 3D-структур та індукції в нейрональному та остеогенному напрямках. Автором застосовано метод отримання мультиклітинних сфероїдів з клітин дермальних папіл шляхом їх культивування у високій концентрації в безсироваткових умовах. Вперше здійснено кріоконсервування волосяних фолікулів вібрис неонатальних кроликів, проведено виділення культури з дермальної папіли кріоконсервованих фолікулів та кріоконсервування даних клітин у вигляді моношару та мультиклітинних сфероїдів.

Автором уперше розроблено підходи до кріоконсервування клітин дермальної папіли кроликів. Встановлено, що в кріопротекторних середовищах на основі ДМСО та після кріоконсервування, в моношарі

культури клітин дермальних папіл состерігається віддалений ефект, що проявляється у збільшенні кількості патологічних поділів клітин та сповільненні росту сфероїдів. Встановлені безпечні та ефективні концентрації ДМСО (5, 7,5 %) при кріоконсервуванні даних об'єктів.

Важливим результатом є підтвердження збереження популяції експресії хромограніну А – білка секреторних гранул хромафінних клітин після кріоконсервування культури клітин з наднирників неонатальних поросят, оскільки дана культура може бути потенційним продуцентом катехоламінів. Встановлено перерозподіл хромогранін-А позитивних клітин між флотуючою та прикріпленою субпопуляціями в процесі культивування, що свідчить про потенціал 3D-культури краще зберігати зазначену популяцію клітин.

Практичне значення отриманих результатів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що виявлені особливості культури дермальної папіли кроликів, дозволяють використовувати їх у якості модельного об'єкту для вивчення поведінки периферійних похідних нервового гребеня в медико-біологічних дослідженнях.

Встановлені дані щодо наявності сублетальних порушень у клітинах дермальної папіли після впливу кріопротектора та кріоконсервування дали змогу встановити поріг безпечної концентрації кріопротектора ДМСО у складі кріозахисного середовища при низькотемпературному збереженні культури клітин дермальної папіли. На основі вдосконалення складу кріозахисного середовища шляхом введення білково-пептидних добавок покращено склад кріозахисного середовища для збереження культури, отриманої у вигляді моношару та сфероїдів.

Дані щодо секреції хромограніну А після кріоконсервування вказують на збереження секреторних властивостей хромафінних клітин у складі 3D-сфероїдів, тому вони можуть потенційно використовуватись в замісній терапії.

Структура, обсяг і зміст дисертації.

Представлена робота викладена за класичним принципом та містить наступні розділи: анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, три розділи результатів власних досліджень, узагальнення результатів, висновки, перелік використаних джерел.

Дисертація викладена на 146 сторінках друкованого тексту і складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, 3 розділів результатів власних досліджень, висновків, списку джерел з 200 найменувань. Робота проілюстрована 27 рисунками, з яких 14 - мікрофотографії та 8 таблицями.

Анотація дає стислий і зрозумілий виклад основних положень дисертаційної роботи.

У вступі здійснена постановка проблеми, описана актуальність та перспективність вивчення обраних об'єктів. Поставлена мета роботи та сформульовані завдання, що потребують вирішення.

В літературному огляді проаналізовані наукові джерела останніх років, що досить детально змальовує сучасний стан вивчення поставленої проблеми у світі. Проаналізовані літературні дані, присвячені вивченню кожного з вивчених типів клітин - похідних нервового гребеня. Наведено багато літературних даних щодо вивчення клітин, отриманих з наднирників, що представляють симпатоадреналову лінію похідних нервового гребеня. Описані дані щодо вивчення цих клітин у різних модельних організмів – як *in vivo*, так *in vitro*. Наведені дані щодо використання культур клітин наднирників при трансплантації. Описаний досвід попередніх досліджень з отримання тривимірних культур, їх особливості.

Розглянуто дані літератури щодо отримання клітин з зони росту волосяних фолікулів різного типу, їх особливості. Описаний фолікулогенний потенціал окремих клітин та можливість отримання нових волосяних

фолукулів з культури клітин дермальної папіли. Наведені посилання на роботи, в яких здійснювалась трансплантація подібних клітин.

В окремих підрозділах після опису кожного з типів клітин-похідних, наведені дані щодо досвіду кріоконсервування даних культур клітин.

В останньому підрозділі літературного огляду детально описані ультраструктурні, функціональні та деякі молекулярно-біологічні особливості мультиклітинних сфероїдів.

В роботі велика увага приділена вибору об'єктів дослідження та дослідних тварин: порівнюються різні типи клітин, отримані з різних модельних тварин – свині, кролика та миші.

Розділ «Матеріали та методи» детально описує методи роботи з вивченими об'єктами. Методи є сучасними та відповідають виконанню сформульованих задач. В роботі активно використовуються методи культивування та кріоконсервування: вивчаються характеристики досліджених культур при створенні різноманітних умов; під впливом різних ростових середовищ, поверхонь культивування; інкубації у кріозахисних середовищах; прийоми моношарового (2D) і об'ємного (3D) культивування. Для отримання культур клітин використовуються різні методики отримання: ферментативне виділення – для отримання культур з наднирників поросят та кроликів, метод експлантів – для отримання культур з волосяних фолікулів мишей та кроликів.

Для вивчення відповідних цитологічних та молекулярних характеристик, використовуються цитологічний, цитохімічний, цитофлуориметричний методи. Таким чином, дослідження виконані на сучасному технічному рівні.

Результати власних досліджень викладені у трьох розділах, в кожному з яких вирішується окрема задача, спрямована на вивчення властивостей клітин-похідних нервового гребеня. В першому розділі власних досліджень в порівняльному аспекті описані функціональні властивості первинних культур наднирників поросят, кроликів та мишей, а також дермальних папіл мишей

та кроликів. Показано здатність формувати 2D- та 3D-культури, а також умови отримання різних типів культур. Здійснено аналіз експресії деяких фенотипічних маркерів в культурі дермальної папіли, показана їх приналежність до ектодермальної лінії. Показана пластичність культур, що підтвердилась шляхом спрямованої індукції в остеогенному та нейрональному напрямках.

В другому розділі детально вивчено вплив кріоконсервування на культури клітин дермальної папіли кролика у вигляді 2D- та 3D-культури. Дизайн експерименту включає проведення двох етапів: 1) дослідження впливу кріопротекторів; 2) безпосереднє дослідження впливу кріоконсервування – відігріву. Вивчається 3 різні склади кріозахисного середовища на основі кріопротектора ДМСО в 5 різних концентраціях – від 5 до 15%. Показано, що збереженість та здатність до культивування культур дермальної папіли мало змінюється на всіх етапах дослідження, проте значних ушкоджень зазнає структура клітин та генетичний матеріал. Такі висновки є важливими та привертають увагу до віддалених наслідків кріоконсервування та впливу кріопротекторних середовищ на даний тип клітин. Встановлено, що безпечною концентрацією для кріоконсервування клітин даного типу є концентрації 7,5% та нижче, при цьому додавання пептидних добавок, підвищує виживання клітин в довготривалій перспективі.

Також в цьому розділі вивчена можливість кріоконсервування культури дермальних папіл кроликів у вигляді мультиклітинних сфероїдів. Показана можливість такого підходу та вивчені проліферативні характеристики культур після деконсервування. Показано, що ростові показники сфероїдів незначним чином сповільнюються після деконсервування, проте згодом досягають контрольних значень.

Продемонстровано, що синтез фенотипічних маркерів та здатність до диференціації в нейрональному та остеогенному напрямках зберігаються після кріоконсервування клітин дермальної папіли – як у вигляді суспензії, так і мультиклітинних сфероїдів.

В третьому розділі власних досліджень вивчається популяція клітин наднирників, яка характеризується експресією білка хромограніна А – попередників хромафінних клітин. Вивчається популяція даних клітин в культурах, отриманих з інтактних та кріоконсервованих фрагментів наднирників. Шляхом комбінації цитохімічного та цитофлуориметричного аналізу показано, що 3D-культивування є оптимальним методом збереження даних клітин.

В кінці кожного розділу приведені обговорення отриманих результатів та їх порівняння з сучасними літературними даними.

Кількісні дані наведені у вигляді середніх зі стандартними відхиленнями, вказані дані, що мають статистичну значущість. Всі кількісні дані відображені в таблицях та графіках.

Узагальнення отриманих результатів наведені у відповідному розділі.

На основі роботи сформульовано 7 висновків, що узагальнюють відповідні етапи робіт. Висновки в роботі відповідають поставленим завданням.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

За темою дисертації опубліковано 15 робіт, з них 4 статті у фахових виданнях України (1 – входить у міжнародну наукометричну базу даних Scopus), 2 статті в закордонному фаховому журналі, 9 публікацій у збірках тез конференцій. Матеріали дисертації в стислому і вичерпному вигляді викладені в авторефераті дисертації.

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

Вважаю, що робота, представлена для рецензування, виконана на високому технічному рівні, описана грамотною мовою та проілюстрована та оформлена відповідно до правил. Принципових зауважень щодо змісту та оформлення дисертації та автореферату не маю. Є деякі недоліки в стилі

оформлення, наприклад на деяких мікрофотографіях наведена масштабна шкала, тоді як на інших вказане лише збільшення.

В процесі рецензування виникли наступні запитання:

1. В першому розділі ваших результатів ви вказуєте на відмінності, які спостерігаються при культивуванні клітин наднирників, отриманих від різних видів тварини. Чим, на вашу думку, зумовлені дані особливості?
2. Ви показали, що кріопротекторні середовища чинять значний вплив на культуру клітин дермальної папіли. Які клітинні структури, на вашу думку, є найбільш чутливими до впливу кріопротектора?

Висновок.

Вважаю, що дисертаційна робота Новікової Оксани Юріївни за темою «Морфофункціональні властивості кріоконсервованих похідних нервового гребеня, отриманих з різних джерел» 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.