

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 на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія
в спеціалізовану вчену раду Д 64.242.01 при Інституті проблем
кріобіології і кріомедицини НАН України

Актуальність обраної теми. Культури клітин на теперішній час стали надзвичайно цінним ресурсом як для академічних досліджень, так і для використання в промислових масштабах. Вони забезпечують відтворені результати наукових експериментів та тестування фармакологічних препаратів, сприяють стандартизації дослідницьких протоколів на рівні світової наукової спільноти. Клітинні культури, без сумніву, є основою тканинної інженерії, метою якої в найближчому майбутньому є створення штучних біологічних тканин і органів. Однією з галузей практичної біотехнології, що активно розвивається, є отримання різних продуктів від клітинних ліній: секретомів, гормонів, ферментів, антитіл і т.д. Крім того, не можна не згадати про досить тривале і успішне використання клітинної терапії в регенеративної і відновлювальної медицині, практиці лікування нейродегенеративних хвороб, діабету і багатьох інших. Відповідно до сучасних протоколів Належної виробничої практики (GMP) та належної лабораторної практики (GLP) кріоконсервування є невід'ємним технологічним етапом при роботі з клітинними культурами. Таким чином, актуальним завданням на сьогодні є не тільки отримання життєздатної клітинної культури, а й відпрацювання протоколу її низькотемпературного зберігання. Саме вирішенню такого одночасно актуального і масштабного завдання була присвячена робота Алі С.Г., а саме: отриманню культури

клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят, опису її основних властивостей і підбору режиму її кріоконсервування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Подана до захисту дисертаційна робота Алі С.Г. «Культивування та кріоконсервування клітин та мультиклітинних сфероїдів зі спінальних гангліїв неонатальних поросят» виконана в Інституті 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).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність. Достовірність отриманих результатів забезпечується належним об'ємом експериментальних даних (в роботі було використано 47 новонароджених поросят для отримання культури клітин) та застосуванням сучасних методів дослідження, а саме: методу ферментативного виділення клітин зі спінальних гангліїв, моношарового (2D) і об'ємного (3D) культивування, кріоконсервування, імуноцитохімічного методу, світлової та флуоресцентної мікроскопії, морфометричного аналізу, методів математичної статистики.

Отриманий фактичний матеріал було опрацьовано адекватними методами статистичної обробки. Достовірність результатів дисертації не викликає сумнівів. Наукові положення та висновки роботи є цілком обґрунтованими та вірогідними, викладені чітко й конкретно, достатньою мірою узагальнюють сутність отриманих результатів та відповідають завданням дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором було сформульовано 5 положень, які характеризують новизну отриманих результатів. *Вперше* було визначено необхідні та достатні умови для отримання культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді моношару або тривимірних сфероїдів. *Вперше* було

охарактеризовано основні морфологічні, імунофенотипові, проліферативні та міграторні властивості культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. *Вперше* було визначено кріостійкість культури зі спінальних гангліїв неонатальних поросят та вплив кріоконсервування на основні структурно-функціональні властивості культури, а також проведено кріоконсервування культури у вигляді суспензії або мультиклітинних сфероїдів. *Вперше* було встановлено оптимальні концентрації кріопротектора ДМСО для отримання істотної кількості життєздатних клітин, зокрема мантийних гліоцитів, та збереження співвідношення основних морфологічних типів клітин у культурі. *Вперше* було встановлено залежність між кількістю пасажів культури та стійкістю клітин до кріоконсервування та виявлено, що кількість пасажів впливає на морфологічну різноманітність клітинних типів у культурі та підвищує її кріостійкість.

Практичне значення отриманих результатів. Результати, отримані в роботі мають практичну цінність для використання в галузях біології, медицини, біотехнології, ветеринарії та фармації. Для культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді моношару або тривимірних сфероїдів автором було розроблено та відпрацьовано цикл «культивування-кріоконсервування-субкультивування», що дозволяє впровадити отриману культуру для практичного використання у вищевказаних галузях. Режим кріоконсервування, отриманий автором, є оптимальним для кріоконсервування мантийних гліоцитів зі спінальних гангліїв, що може бути застосовано в практиці кріоконсервування гліальних клітин, отриманих із 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.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати наукових досліджень Алі С.Г. обговорювались та доповідались на 6 вітчизняних та міжнародних науково-практичних конференціях.

Оцінка змісту дисертації

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію представлено українською мовою на 156 сторінках, включаючи список використаної літератури – 262 джерела. Дисертаційна робота побудована за класичним планом та містить: анотацію, зміст, перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень та термінів, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, два розділи результатів власних досліджень, узагальнення результатів, висновки, перелік використаних джерел, додатки. Дисертаційну роботу проілюстровано 19 рисунками, 29 мікрофотографіями і 1 таблицею. Матеріали дисертації викладено з дотриманням норм наукового стилю та правильним вживанням фахової термінології; між послідовними частинами дисертації наявний чіткий причинно-наслідковий зв'язок.

У розділі **Вступ** чітко та повно визначено актуальність проблеми, мету та завдання роботи, сформульовано об'єкт і предмет дослідження, викладені наукова новизна і практичне значення одержаних результатів. Надано відомості про особистий внесок здобувача, апробацію та об'єм матеріалів дисертації.

Зауважень до розділу немає.

Розділ **Огляд літератури** складається з 6 підрозділів, в яких автор аналізує структурно-функціональні особливості спінальних гангліїв, морфологічні та фенотипові властивості мантийних гліоцитів, підходи до культивування клітин чутливих гангліїв та закономірності формування мультиклітинних сфероїдів. Автором проведено пошук існуючих способів кріоконсервування культур нейральних клітин, як у вигляді суспензії, так і в складі мультиклітинних сфероїдів. На основі цього можна заключити, що на теперішній час не існує способів кріоконсервування мантийних гліоцитів спінальних гангліїв, що підкреслює новизну представленого дослідження.

Зауважень до розділу немає.

Розділ «**Матеріал та методи дослідження**» надано у 16 підрозділах, які детально описують загальний дизайн дослідження та використані методи. У роботі автор застосував сучасні методи експериментального дослідження та статистичного аналізу, що дозволило досягти встановлену мету й виконати поставлені завдання, отримати чіткі й достовірні результати, зробити належні висновки.

Зауважень до розділу немає.

У Розділі «**Морфофункціональні і імунофенотипові властивості культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят під час культивування у вигляді моношару або мультиклітинних сфероїдів**» детально охарактеризовано основні властивості культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят за умов 2D- та 3D-культивування. Автором було встановлено необхідна умова переходу отриманої культури з двовимірної до тривимірної структурної організації, якою виявилася наявність фетальної телячої сироватки у середовищі культивування. Виявилось, що у середовищі з сироваткою утворюється моношарова культура, в той час як у присутності замінників сироватки (B27, Нейромакс) – мультиклітинні сфероїди. При цьому зберігаються основні морфологічні типи клітин у складі культури. Автором було встановлено, що клітини культури експресують маркер мантійних гліоцитів глутамінсинтетазу, маркер нейронів β -III-тубулін, але не експресують маркер шваннівських клітин S100.

Питання до розділу.

1. *Чи можуть бути присутні фібробласти у отриманих Вами 2D- та 3D-культурах. Чи має культивування у той чи інший спосіб перевагу у селекції мантійних гліоцитів та елімінації фібробластів?*

У Розділі «**Вплив кріоконсервування у кріозахисних середовищах із різною концентрацією ДМСО на морфофункціональні та імунофенотипові властивості культури клітин зі спінальних гангліїв**

неонатальних поросят» представлено результати дослідження впливу кріоконсервування під захистом ДМСО на властивості культури, консервованої у вигляді клітинної суспензії або мультиклітинних сфероїдів. Автором було проведено кріоконсервування культури у вигляді клітинної суспензії в середовищах, що містять ДМСО в концентраціях 5, 7,5 та 10%, і з використанням трьохетапного режиму охолодження. При цьому життєздатність клітин спостерігалася на рівні 83-87%, вихід клітин на рівні 63-78% від контролю, а також було збережено характерні морфологічні типи клітин (при цьому до 95% мантийних гліоцитів) і експресію глутамінсинтетази та β -III-тубуліну. Враховуючи високу чутливість клітин нейрального походження до факторів кріоконсервування, це є успішним результатом.

Автором також було здійснено кріоконсервування моношарової культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят на різних пасажах. В результаті доведено, що клітини першого пасажу є більш стійкими до кріоконсервування, ніж первинна культура, при цьому найкращий результат (збереження клітин на рівні 90,6% від контролю) було отримано при застосуванні кріозахисного середовища з 7,5% ДМСО.

Кріоконсервування у вигляді мультиклітинних сфероїдів дозволило зберегти основні властивості отриманої 3D-культури: здатність до адгезії, усі морфологічні типи клітин і експресію глутамінсинтетази та β -III-тубуліну, хоча й призводило до зниження клітин сфероїдів до міграції та формування моношару.

Зауважень до розділу немає.

У Розділі Узагальнення та аналіз результатів автором стисло та у логічної послідовності наведено отримані дані, при цьому власні спостереження обговорено та порівняно із сучасними досягненнями інших авторів.

Висновків сім. Вони відповідають поставленим завданням та відображають основний зміст дисертації.

Зауважень немає.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

Всі матеріали дисертаційної роботи Алі С.Г. викладені в 11 працях, з них: 4 статті в спеціалізованих виданнях України, 2 з яких входять до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 стаття у зарубіжному журналі, 6 тез 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 дисертації.

Принципових зауважень щодо змісту дисертації та автореферату немає. Однак при ознайомленні з роботою виникли наступні *дискусійні запитання*:

1. Автор встановив імунофенотипову гетерогенність первинної культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят, отриману як у вигляді моношару, так й у вигляді мультиклітинних сфероїдів. Однак про імунофенотипову гетерогенність мультиклітинних сфероїдів автор робить висновки на основі експериментів по пересіву сфероїдів у адгезивні умови, де клітини мігрують з них та утворюють моношар. Саме цей моношар вивчав автор. Чи можна стверджувати, що експресія фенотипових маркерів, встановлена у моношарі після пересіву сфероїдів, буде притаманна клітинам сфероїду від самого початку?

2. Автор розглядає «морфо-функціональні властивості» клітин культури. Що він має на увазі під цим терміном? Чи досліджувалися специфічні функції клітин у отриманих культурах?

ВИСНОВОК

Вважаю, що дисертаційна робота Алі Сабіни Гульзарівни «Культивування та кріоконсервування клітин та мультиклітинних сфероїдів зі спінальних гангліїв неонатальних поросят» є завершеною працею, яка в сукупності вирішує важливе наукове завдання отримання культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят у вигляді моношару та мультиклітинних сфероїдів та її кріоконсервування. За актуальністю теми, методичним рівнем проведених досліджень, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів дисертаційна робота Алі Сабіни Гульзарівни 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.

Старший науковий співробітник
відділу наноструктурних матеріалів
ім. Ю.В. Малюкіна
Інституту сцинтиляційних матеріалів
Національної академії наук України,
кандидат біологічних наук

Кавок Н.С.

Підпис Кавок Н.С. засвідчую:
учений секретар ІСМА НАН України



Дацько Ю.М.