

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Новікової Оксани Юріївни

**«Морфофункціональні характеристики кріоконсервованих похідних
нервового гребеня, отриманих з різних джерел»,**

поданої на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія

На теперішній час культивування та кріоконсервування клітин з високим проліферативним і диференціювальним потенціалом є необхідними для численних біомедичних досліджень. У цьому аспекті культури клітин-похідних нервового гребеня, отриманих у постнатальний період, представляють собою важливий об'єкт для вивчення процесів регенерації нервової системи, механізмів розвитку нейродегенеративних та інших порушень.

Дисертаційна робота Новікової Оксани Юріївни «Морфофункціональні характеристики кріоконсервованих похідних нервового гребеня, отриманих з різних джерел» присвячена актуальним проблемам впливу кріоконсервування у середовищах з кріопротектором диметилсульфоксидом (ДМСО) на морфологічні, цитогенетичні та функціональні властивості 2D- та 3D-культур, отриманих з наднирників (НН) та дермальних папіл (ДП) неонатальних експериментальних тварин.

Поставлені в роботі завдання відповідають меті і відображають тему дисертації.

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

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).

Структура, обсяг і зміст дисертації.

Дисертація Новікової О.Ю. побудована за традиційним академічним зразком. Робота викладена на 146 сторінках і складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи», трьох розділів результатів власних досліджень, заключення, висновків, списку використаних джерел літератури і додатку, що включає список робіт, в яких опубліковано результати дисертації. Фактичний матеріал ілюстрований 27 рисунками, 14 мікрофотографіями і 8 таблицями. Список використаної літератури включає 200 джерел.

У вступі є всі необхідні підрозділи, в яких дисертантка обґрунтувала актуальність обраної теми, сформулювала мету і завдання дослідження, позначила об'єкт, предмет та використані в роботі методи, визначила наукову новизну і практичну значимість результатів, а також свій особистий внесок, вказала науково-дослідну тему, в рамках якої виконана робота та наукові форуми, на яких проходила апробацію результатів.

В огляді літератури автором викладені сучасні уявлення про формування нервового гребеня та його регіональних похідних, проаналізовані дані літератури стосовно структурно-функціональних характеристик похідних, що знаходяться в наднирниках та у волосяному фолікулі у постнатальний період. Описаний світовий досвід культивування та кріоконсервування клітин–похідних нервового гребеня, отриманих з наднирників та дермальних папіл, а також наведені основні етапи формування та організації мультиклітинних сфероїдів (МС) за умов 3D культивування. На основі аналізу даних літератури сформульовані найменш

вивчені аспекти і обгрунтовані напрямки досліджень, що обрані у дисертаційній роботі.

У розділі «Матеріали і методи» детально описані методи, які використані в дисертаційній роботі.

У розділі 3 описані власні дослідження клітин НН та ДП неонатальних тварин у культурі. Звертає на себе увагу об'єм проведеної роботи: 3 види експериментальних тварин, 2 види тканин і 2D та 3D-системи культивування. На першому етапі дисертантка в певних умовах моношарового та об'ємного культивування оцінила поведінку клітин НН поросят, кроликів та мишей і виявила характерні особливості для досліджуваних видів тварин. Надалі в роботі були отримані культури ДП кроликів і мишей. Автором продемонстровано керування поведінкою клітин, а саме - їх сфероїдоутворенням або міграцію з наступним формуванням моношару при культивуванні клітин ДП у середовищі з вилученням або додаванням фетальної сироватки. В цьому розділі наведено результати фенотипування культивованих клітин ДП, які виявилися позитивними за такими маркерами, як тубулін, віментин і глутамінсінтетаза, та негативними на маркер астрогліальних клітин - білок S100, а також на C-kit (CD117). Оцінена здатність культивованих клітин ДП до індукованого диференціювання в остеогенному та нейрональному напрямках. Проведені дослідження отриманих культур свідчать про достатньо високий методичний рівень роботи.

Розділ 4 присвячений визначенню цитологічних змін та пошкоджень культивованих клітин ДП кроликів після їх інкубації у кріозахисних середовищах на основі ДМСО та після кріоконсервування. Автором проведено детальний цитологічний аналіз при субкультивуванні інкубованих/кріоконсервованих клітин протягом 2-х пасажів. Встановлено збільшення кількості патологій мітозів в оброблених ДМСО клітинах на 2-му

пасажі в порівнянні з 1-м, що свідчить про пошкодження генетичного апарату досліджуваних клітин. Встановлено також, що після інкубації у середовищах з високими концентраціями ДМСО (12,5% та 15%) і при відсутності білково-пептидних добавок клітини були зовсім не здатні до проліферації і наступного субкультивування. Додавання 5% БСА або 5% Албутрісану визначено найбільш ефективним при використанні ДМСО у концентраціях 5% і 7,5 %, відповідно, як у дослідах з інкубацією, так і при кріоконсервуванні. У заключній частині цього розділу були наведені результати кріоконсервування клітин ДП у вигляді мультиклітинних сфероїдів під захистом 5% та 10 % ДМСО.

У розділі 5 наведені власні результати щодо вивчення субпопуляції хромогранін А-позитивних клітин у культурах, отриманих з нативних та кріоконсервованих фрагментів НН неонатальних поросят. Цей фрагмент роботи має декілька автономний характер в дисертації, але доповнює існуючі уявлення про можливість отримання ХрА-позитивних клітин з кріоконсервованого біоматеріалу та особливості їх наступного культивування у 2D- та 3D-системах.

Таким чином, проведені дослідження мають наукову новизну і практичне значення, які Новікова О.Ю. об'єктивно сформулювала в дисертації та авторефераті.

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше отримана культура клітин ДП неонатальних кроликів у вигляді моношару та мультиклітинних сфероїдів, описані її морфологічні, фенотипічні, проліферативні властивості. Встановлено здатність отриманої культури до тривалого субкультивування зі збереженням потенціалу до формування МС та індукції диференціювання в нейрональному та остеогенному напрямках.

У роботі вперше показано, що вилучення фетальної телячої сироватки (ФТС) із культурального середовища є необхідним для формування МС у культурах ДП неонатальних кроликів.

Уперше проведено кріоконсервування МС та моношарової культури клітин, отриманих з ДП неонатальних кроликів.

Уперше встановлено, що після інкубації в кріозахисних середовищах на основі ДМСО та після кріоконсервування клітин ДП здійснюється віддалений ефект, що проявляється у збільшенні кількості патологічних поділів клітин у моношаровій культурі та відбувається сповільненні росту МС. Встановлені безпечні та ефективні концентрації ДМСО (5%, 7,5 %) при кріоконсервуванні даних об'єктів.

Вперше проведено аналіз впливу кріоконсервування на характер експресії хромограніну А – білка секреторних гранул хромафінних клітин, отриманих до і після кріоконсервування фрагментів НН неонатальних поросят. Встановлено перерозподіл субпопуляцій у культурі клітин НН у процесі культивування, що проявляється у відносному збільшенні кількості клітин в складі МС.

Практичне значення отриманих результатів.

Отримані в роботі дані вказують на наявність морфологічних та функціональних відмінностей у культурах клітин НН та ДП, що отримані з різних біологічних видів ссавців.

Виявлені морфологічні, фенотипічні та індукційні властивості культур ДП кроликів можуть бути використані для стандартизування у якості модельного об'єкту для вивчення поведінки периферійних похідних НГ. Збереження основних характеристик культури після кріоконсервування дозволяє запропонувати цей об'єкт для використання в медико-біологічних дослідженнях.

На основі вдосконалення складу кріозахисного середовища шляхом введення білково-пептидних добавок покращено режим кріоконсервування культури клітин ДП кроликів.

Встановлені дані щодо наявності сублетальних порушень у клітинах ДП після впливу кріопротектора ДМСО та кріоконсервування дали змогу встановити поріг безпечної концентрації ДМСО у складі кріозахисного середовища при низькотемпературному збереженні культури клітин ДП кроликів.

Дані щодо секреції хромограніну А після кріоконсервування вказують на збереження секреторних властивостей хромафінних клітин наднирників у культурі, що представляє цінність для замісної терапії.

У дисертаційній роботі Новікової О.Ю. витриманий науковий стиль написання. У заключенні відображена логіка всієї роботи і перспективність даного дослідження. Дисертаційна робота Новікової О.Ю. виконана на достатньому обсязі експериментальних досліджень. Використані в роботі методи адекватні поставленим завданням. На підставі серйозного аналізу автор робить обґрунтовані і коректні висновки.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

Матеріали дисертації в повній мірі представлені в опублікованих роботах і в авторефераті. Основні положення дисертаційної роботи Новікової О.Ю. викладені в 15 наукових роботах, з яких 4 статті у фахових виданнях України (1 - входить в міжнародну наукометричну базу Scopus), 2 статті в зарубіжному журналі, 9 публікацій у збірниках тез конференцій.

Зміст автореферату виходить із змісту дисертації та висвітлює її положення і висновки.

В ході аналізу дисертаційної роботи виникли певні питання:

1. Чи зберігають клітини ДП фенотип і здатність до індукованого остеогенного та нейронального диференціювання після їх перебування у складі мультиклітинних сфероїдів?
2. Як Ви можете пояснити, що після інкубації з ДМСО у концентраціях 12,5% та 15 % клітини ДП були не здатні до субкультивування на 2-му пасажі, тобто не проліферували, а в той же час після кріоконсервування під захистом ДМСО в таких же концентраціях, спостерігалася їх проліферація протягом 2-х пасажів?

Недоліки дисертаційної роботи та автореферату щодо змісту і оформлення:

1. У таблиці 4.4 , на рисунках 4.9, 4.10 та 4.11 в дисертації, а також на рисунку 9 в авторефераті відсутні позначення статистично значущих відмінностей.
2. Фенотип та здатність до індукованого остеогенного та нейронального диференціювання кріоконсервованих клітин дермальних папіл неонатальних кроликів скорочено описані в розділі 3, де надається характеристика нативної культури.
3. У тексті дисертації зустрічаються стилістичні та граматичні похибки.

Хотілося б відзначити, що наведені мною зауваження не мають принципового характеру і не знижують високої наукової і практичної цінності роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Новікової Оксани Юріївни за темою " Морфофункціональні характеристики кріоконсервованих похідних нервового гребеня, отриманих з різних джерел " є завершеним науковим дослідженням, в якому отримані науково обґрунтовані дані. Дисертаційна робота містить теоретичне обґрунтування й експериментальне вирішення задачі отримання культур клітин з похідних нервового гребеня (дермальних папіл та наднирників) неонатальних тварин у вигляді моношару та мультиклітинних сфероїдів, а також визначення оптимальних умов їх зберігання шляхом кріоконсервування. За актуальністю, обсягом досліджень, ступенем обґрунтованості наукових положень та висновків, а також науковою новизною, теоретичним і практичним значенням і методичним рівнем дисертаційна робота Оксани Юріївни Новікової 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
лабораторії протирадіаційних засобів і
клітинних технологій ДУ «Інститут
медичної радіології та онкології
ім. С.П. Григор'єва НАМН України»,
кандидат біологічних наук

Скоробогатова Н. Г.

Підпис

ЗАВІРЕНО

Вчений секретар

ДУ «ІМРО ім. С.П. Григор'єва НАМН України»

" 20 " Р

