

## ВІДЗИВ

### офіційного опонента

на дисертаційну роботу КУШНІРУК Вероніки Олегівни  
"Каріотипічна еволюція стовбурових клітин дорослої людини нової лінії 4BL  
при адаптації до умов *in vitro*", представлену до захисту на здобуття наукового  
ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна  
генетика

Іморталізовані клітинні лінії, отримані із нормальних клітин людини, є цінними модельними об'єктами досліджень у біології та медицині. Створення таких ліній і вивчення їхніх властивостей – один із важливих напрямків сучасної клітинної біології і суміжних дисциплін. Дисертаційна робота В. О. Кушнірук присвячена систематичному дослідженню генетичних особливостей нової клітинної лінії 4BL, створеної за участі автора на основі клітин периферійної крові дорослого донора без використання чужорідного генетичного матеріалу. Зважаючи на високий потенціал використання цієї лінії в цитогенетичних, молекулярно-біологічних і медичних дослідженнях, тему дисертаційної роботи слід визнати **актуальною** – перш за все, з прикладної точки зору.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, а також підтримана двома грантами.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 165 сторінок основного тексту і 4 додатки. Основна частина дисертації ілюстрована 47 рисунками і 5 таблицями, список використаних джерел містить 411 посилань, серед яких переважають роботи останніх років. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 17 публікацій, в тому числі 7 статей у вітчизняних фахових наукових виданнях, з яких 3 надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо способів отримання клітинних ліній, мінливості їхнього каріотипу та каріотипічних змін при культивуванні клітин *in vitro* є стислим, але змістовним – таким, що демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів клітинної і молекулярної біології та молекулярної генетики, описаних у Розділі 2: методи культивування клітин *in vitro*, стандартні методи цитогенетики (рутинне і диференційне забарвлення хромосом), флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH), порівняльна геномна гібридизація, кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, вестерн-блотинг, біоінформатичні методи тощо.

Робота В. О. Кушнірук мала на меті встановити загальні властивості клітин лінії 4BL (морфологію клітин, їхній стовбуровий потенціал, імунофенотип та ростові властивості), а також особливості їхнього каріотипу та його змін протягом тривалого культивування і деякі можливі функціональні наслідки таких змін. Отримані результати представлені у двох розділах.

Розділ 3 присвячено аналізу морфологічних, стовбурових і ростових властивостей клітин лінії 4BL. Представлені результати свідчать, що клітини досліджуваної лінії представлені двома морфологічними типами – фібробласто- та епітеліоподібними. Показано, що клітини 4BL здатні до багатошарового росту при високій щільності та до утворення округлих колоній у напіврідких середовищах. Продемонстровано здатність клітин 4BL диференціюватись у відповідних середовищах у напрямку остеоцитів, адипоцитів і міоцитів, що підтверджує високий стовбуровий потенціал цих клітин. Охарактеризовано імунофенотип клітин 4BL і показано наявність типових маркерів мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин.

У більш об'ємному розділі 4 представлено результати дослідження каріотипічних і деяких молекулярно-генетичних характеристик клітин лінії 4BL. Перш за все, було проведене рутинне каріотипування клітин 4BL на різних пасажах (до 221-го) і показано, що більшість клітин на усіх пасажах мають приблизно диплоїдну кількість хромосом. Проте, завжди присутні також

гіпоплоїдні клітини і спостерігається тенденція підвищення плоїдності на пізніх пасажах. Ці результати були підтверджені також завдяки ретельного цитогенетичного аналізу на основі диференційного забарвлення хромосом. У цій частині роботи представлено також дані про хромосомні аберації, виявлені на різних пасажах за допомогою як диференційного забарвлення хромосом, так і FISH.

Важливим доповненням традиційних цитогенетичних досліджень став проведений автором аналіз результатів порівняльної геномної гібридизації ДНК клітин 4BL на різних пасажах та контрольної геномної ДНК людини, який дозволив виявити делеції і дуплікації, що з'явилися у процесі культивування. Окремої похвали заслуговує те, що автор не обмежилася констатацією отриманих результатів, а провела біоінформатичний аналіз з метою виявлення груп генів, що знаходяться в регіонах делецій та дуплікацій. Представлені автором результати свідчать, що основні хромосомні перебудови відбулись в клітинах 4BL до 120 пасажу, а функціональні наслідки таких перебудов полягають, в основному, у підвищенні дози генів, залучених у регуляцію мітозу, на фоні зниження кількості копій генів-супресорів пухлинного росту і підвищення кількості копій генів-індукторів апоптозу. В останньому підрозділі розділу 4 представлено результати експериментального визначення рівня експресії в клітинах 4BL кількох важливих генів – теломерази, p53 і репаративного ензиму MGMT. Наявність експресії першого гена і відсутність такої двох останніх підтверджує, що лінія 4BL може розглядатись як іморталізована клітинна лінія з підвищеною здатністю до перебудов генетичного матеріалу.

У Розділі 5, який присвячено обговоренню отриманих результатів, автор, аналізуючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, узагальнює виявлені закономірності щодо еволюції каріотипу клітин 4BL при їхньому культивуванні і обґрунтовує можливе використання цієї лінії як модельного

об'єкту для досліджень мінливості та процесів адаптації клітин до умов тривалого культивування.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи В. О. Кушнірук полягає в тому, що в ній отримано нову іморталізовану клітинну лінію із периферійної крові здорового дорослого донора без використання чужорідного генетичного матеріалу і охарактеризовано генетичні зміни, які відбулись у клітинах цієї лінії при їх довготривалому культивуванні. Представлені у роботі дані збагачують знання щодо процесів еволюції клітин при їх культивуванні *in vitro*. Досліджена у роботі клітинна лінія може бути використана як модельний об'єкт для вивчення процесів мінливості клітин у культурі, механізмів адаптації клітин до культивування *in vitro*, а також для тестування лікарських препаратів і досліджень механізмів канцерогенезу. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузях клітинної біології і молекулярної генетики, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які використовують клітинні лінії для фундаментальних досліджень і пошуку нових підходів у лікуванні захворювань.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати загальну **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків**.

Проте, до дисертаційної роботи В. О. Кушнірук виникли наступні **зауваження та запитання**.

1. Залишається не зовсім зрозумілим, з якою метою вивчались криві росту клітин 4BL на різних пасажах, які суттєво не розрізняються між собою (не враховуючи незначні деталі). Крім того, не зовсім коректними представляються міркування з приводу кривих на рис. 3.17 (на кшталт "ріст клітин сповільнюється на добу, а з четвертою доби починається наступний період експоненційного росту, який ... триває до п'ятої доби") – мова йде про криві,

отримані однократно, одна точка на 5-й добі (146-й пасаж) не дозволяє казати про новий експоненційний ріст. Очевидно, що насправді для клітин усіх пасажів спочатку (іноді після нетривалого лаг-періоду) спостерігається експоненційний ріст, потім плато, яке змінюється пригніченням чисельності. Саме так і виглядають усереднені криві, отримані на основі кількох незалежних експериментів, на наступних двох рисунках. Слід тільки зауважити, що, всупереч твердженню автора, на рис. 3.18 для усередненої кривої зовсім не спостерігається "новий пік чисельності" на восьму добу.

2. У табл. 4.1 і 4.2 представлено дані щодо розподілу клітин за плоідністю на різних пасажах. По-перше, перша з цих таблиць представляється зайвою: вся змістовна інформація представлена у другій таблиці. По-друге, що означають числа після  $\pm$  у цих таблицях? Як можна зрозуміти, у таблицях представлені частоти клітин з певною плоідністю серед 100 клітин, які аналізувались. Що означає помилка в даному випадку?

3. На рис. 4.3а представлено коефіцієнт варіації каріотипів та рівень присутності білка MGMT у клітинах 4BL на різних пасажах. Коментуючи ці дані, автор наводить значення коефіцієнту кореляції Пірсона між двома показниками. Оскільки в даному випадку обидва показники, очевидно, не підпорядковані нормальному розподілу і між ними немає *прямої* кореляції, більш коректним було б використати коефіцієнт кореляції Спірмена. Крім того, взагалі виглядає трохи дивним коефіцієнт кореляції між двома показниками, значення одного з яких (експресія) просто дорівнює нулю для всіх точок крім двох.

4. Коментуючи дію стресового чинника на варіацію каріотипів (рис. 4.3б), автор стверджує, що після дії цього чинника "підтримуючий стабілізуючий добір в культурі змінюється на рушійний". На якій підставі автор вважає, що при культивуванні клітин (без стресового чинника) на клітини діє стабілізуючий добір? Таке твердження потребує доказів. По-друге, зростання коефіцієнта варіації каріотипів після дії стресового чинника означає тільки

підвищення рівня мінливості і зовсім не означає, що починає діяти рушійний добір.

5. Наприкінці підрозділу 4.1 автор стверджує, що "в процесі тривалого культивування клітинної лінії 4BL відбувається каріотипна еволюція, яка має хвилеподібний характер". На чому базується таке твердження і про які хвилі йде мова?

6. У підрозділі 4.3 автор стверджує, що на 205-му пасажі досліджувана клітинна лінія "перебуває на стадії стабілізації". Не зовсім зрозуміло, на чому базується це твердження. Адже, з одного боку, 205-й пасаж – один з останніх, як можна бути впевненим у стабілізації? З іншого боку, наведені дані порівняльної геномної гібридизації свідчать, що більшість хромосомних перебудов відбулось до 122-го пасажу, після чого, як можна думати, культура і стабілізувалась.

7. Не зовсім вдало сформульована преамбула висновків: (1) в дисертаційній роботі дійсно *обговорюється* порівняння культури 4BL зі стовбуровими та раковими клітинними лініями, але, строго кажучи, "порівняльний аналіз" з такими лініями не проводився; (2) залишається незрозумілим, що саме, на думку автора, "подібно до умов в організмі".

Незважаючи на наведені зауваження, загальна оцінка роботи є позитивною: в цілому, дисертація демонструє належний рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх.

**Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій.** Дисертаційна робота Кушнірук Вероніки Олегівни "Каріотипічна еволюція стовбурових клітин дорослої людини нової лінії 4BL при адаптації до умов *in vitro*" є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів»,

затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,  
доктор біологічних наук, професор,  
професор кафедри загальної та медичної генетики  
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського  
національного університету імені Тараса Шевченка



А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського  
національного університету імені Тараса Шевченка



*Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка* **З. А.**