

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Шувалової Надії Сергіївни**

**ОПТИМІЗАЦІЯ КИСНЕВОГО СТАНУ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ
МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН З ПУПКОВОГО
КАНАТИКА ЛЮДИНИ**”, подану на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук за спеціальністю **03.00.20 – біотехнологія**

1. **Актуальність теми дисертації.** Розробка технологій сучасної клітинної терапії на основі культивованих клітин пов'язана із використанням фізико-хімічних підходів щодо оптимізації умов наближених до фізіологічних процесів в системі багатоклітинного організму. Саме тому, дисертаційна робота Шувалової Н.С. присвячена вирішенню актуальної проблеми пошуку нових підходів до системної оптимізації культивування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) з врахуванням не лише компонентів рідкого середовища, а й співвідношення газів, необхідних для життєдіяльності клітин. Такий комплексний підхід може бути більш ефективним для отримання МСК у необхідних для використання в стратегіях регенеративної медицини кількостях і водночас із збереженням терапевтичного потенціалу. Доцільність дослідження пов'язана з тим, що культивування МСК з різних джерел у загальноприйнятих умовах CO₂-інкубатора супроводжується процесами старіння, деградації та трансформації культури. На сьогоднішній день перспективним методом збереження унікальних нативних властивостей МСК з різних джерел вважається культивування за умов, близьких до фізіологічних. Незважаючи на існуючі багаточисельні дослідження, питання щодо відсоткового вмісту кисню в штучних умовах CO₂-інкубатора на особливості функціонування культури МСК з Вартонового студня (МСК-ВС) залишається відкритим. Також важливими аспектами щодо використання МСК-ВС в терапії різних патологій розглядаються такі умови як стан помірної гіпоксії, а також трансфекція клітин цільовими генами,

які могли б промотувати секрецію в кондиційоване середовище культивованих клітин певних цитокінів, факторів росту інших біологічно-активних клітинних компонентів, необхідних в регенеративній терапії. Окремим завданням є дослідження додаткових шляхів оптимізації методів культивування за фізіологічних концентрацій кисню, наприклад, використовуючи газові суміші на основі інертних газів, зокрема аргону, оскільки на сьогодні розглядається питання його цитопротекторного ефекту. Необхідність наукового фундаментального обґрунтування нового підходу до оптимізації культивування МСК була поставлена за мету і завдання даного наукового дослідження.

У дисертаційній роботі Шувалової Н.С. представлені результати експериментальних досліджень культивування МСК Вартонова студня людини (МСК-ВС) за знижених концентрацій кисню, в газових сумішах на основі азоту і аргону та виявлено вплив таких умов на особливості отримання первинних культур МСК-ВС, їхні проліферативні, морфологічні характеристики, та ефективність невірусної трансфекції МСК-ВС.

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за темами «Перетворювальний потенціал нативних та модифікованих стовбурових клітин і його реалізація *in vitro* і *in vivo*» (реєстраційний номер 0112U007302, 2009-2013 р.р.) та «Вивчення сигнальних міжклітинних взаємодій в культурі та організмі мишей» (реєстраційний номер 0112U004218, 2013-2017 р.р.).

2. **Наукова новизна роботи** полягає в розробці підходів створення газових сумішей зі зниженим вмістом кисню, на основі азоту та аргону, за використання яких вперше встановлено, що застосування культивування за фізіологічних концентрацій кисню дозволяє покращити ефективність отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів. Запропоновано новий метод оптимізації отримання первинних культур МСК-ВС за

фізіологічних концентрацій кисню та використання при цьому сумішей на основі азоту і аргону, перевірено та підтверджено позитивний вплив даної газової комбінації на проліферативні та морфологічні особливості культур МСК-ВС. Вперше досліджено ефекти культивування МСК-ВС в газовій суміші на основі аргону і показано різницю в біологічних ефектах сумішей, створених на основі різних газів. Також, вперше показано, що проведення процедури невірусної трансфекції культур МСК-ВС за умов помірної гіпоксії сприяє збільшенню кількості трансфікованих клітин цільовими генами.

3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Теоретичне значення дослідження полягає в доповненні фундаментальних знань щодо впливу параметрів культивування на біологічні властивості не іморталізованих культур, а саме, встановлено та описано ефекти застосування фізіологічних концентрацій кисню на популяцію МСК-ВС. Запропоновано нові методики для оцінки різних аспектів життєдіяльності клітинних культур: ефективності отримання первинних культур, морфологічної оцінки МСК-ВС в процесі культивування. Виявлений феномен підвищення ефективності невірусної трансфекції за фізіологічних концентрацій кисню є підґрунтям для виявлення механізмів такого ефекту.

Практичне значення отриманих результатів полягає в обґрунтуванні доцільності широкого застосування культивування МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню. Запропоновано схеми створення газових сумішей зі зниженим вмістом кисню та розроблено протоколи культивування МСК-ВС в них. Розроблено техніку отримання первинних культур МСК-ВС в умовах пониженої концентрації кисню, та доведено її ефективність. Також, в ході роботи було запропоновано нові схеми прискореної оцінки стану первинних культур та оптимізовано морфологічний аналіз клітинних культур шляхом введення додаткового морфологічного параметру для оцінки форми клітини. Запропоновано нові

підходи до оптимізації генетичної модифікації культур МСК (а саме невірусної трансфекції) з використанням газових сумішей із фізіологічними концентраціями кисню, що потенційно може бути застосований також для інших клітинних культур.

4. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Наукові положення, висновки і рекомендації дисертаційної роботи ґрунтуються на всебічному аналізі отриманих експериментальних даних, інтерпретація яких була здійснена з урахуванням сучасних відомостей та уявлень про стан проблеми, виявлених в ході аналізу наукової літератури.

Об'єкт, предмет та завдання дослідження логічно і структурно узгоджені. Для вирішення поставленої наукової задачі здобувачем було використано сучасні методи дослідження. Кількісний і якісний аналіз отриманих даних проведено з використанням комп'ютерних технологій, що дозволяє коректне обґрунтування висновків. Враховуючи вищевказане, обґрунтованість викладених в роботі положень не викликає сумніву. Структура роботи побудована згідно існуючих правил щодо оформлення кандидатських робіт.

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.

Дисертацію побудовано за традиційним планом. Вона складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 1 розділу власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. На початку роботи наведено перелік використаних позначень та скорочень. Текст дисертації викладено українською мовою на 150 сторінках комп'ютерного набору. Робота складається з чотирьох розділів (огляд літератури, матеріали та методи, результати, обговорення і узагальнення результатів). Дисертація ілюстрована 28 рисунками, 8 таблицями. Список літератури містить 194

джерела, серед яких 190 зарубіжних авторів.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; мета і задачі дослідження; дано визначення об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації; публікації, а також про структуру та обсяг дисертації.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з 5 підрозділів. У підрозділі **1.1 Мезенхімальні стовбурові клітини - субпопуляція стовбурових клітин дорослого організму** висвітлено сучасні погляди на особливості біології мезенхімальних стовбурових клітин з різних джерел, і особливо автором наголошено щодо особливостей, МСК, які виділяють з Вартонова студня. В підрозділі **1.2 Особливості та проблеми культивування МСК** окреслено загальні тенденції та сучасні проблеми в питанні культивуванні стовбурових клітин, з різних джерел. Наведено аналіз уявлень про основні пошкоджуючі фактори, що супроводжують гетерогенні розшарування СК з різних джерел під час культивування в загальноприйнятих умовах, та вказано сучасні погляди на можливі шляхи оптимізації методів культивування з метою посилення терапевтичного потенціалу СК, зокрема, для МСК з Вартонова студня. В підрозділі **1.3 . Концентрація кисню в тканинах організму ссавців** наведено сучасні відомості щодо фізіологічних концентрацій кисню у тканинах організму. Також, описано основні відомі механізми чутливості клітин до кисню, та регуляції адаптації клітин до зміни концентрації кисню. Також, висвітлено біологічне значення кисню у регуляції життєдіяльності стовбурових клітин. В підрозділі огляду літератури **1.4 Деякі аспекти культивування МСК за фізіологічних концентрацій кисню** проаналізовано можливість технології культивування МСК шляхом наближення концентрацій кисню до таких, що відповідають фізіологічним, і наведено відомі з літератури дані щодо

впливу умов помірної гіпоксії на різноманітні аспекти життєдіяльності МСК в умовах *in vitro*, а саме проліферацію, диференціацію, процеси старіння тощо. У підрозділі 1.5. **Біологічні ефекти інертних газів** розглянуто розрізнені відомості щодо висвітлених в літературі питань біологічних ефектів інертних газів на життєдіяльність клітинних культур та можливість їх застосування для підвищення ефективності культивування клітин різного тканинного походження. Ґрунтуючись на проаналізованих даних в кінці розділу «Огляд літератури» сформульовано наукові завдання даної роботи, та висвітлено підходи, які використовуються для їх вирішення. Варто зазначити, що автором надані останні експериментальні дані з питань, що стосуються теми дисертації. Підсумовуючи огляд літератури, дисертанткою зазначено, що культивування МСК з різних джерел за фізіологічних концентрацій кисню має позитивний вплив на життєдіяльність культур. Однак, питання щодо впливу умов помірної гіпоксії на МСК Вартонова студня на сьогодні недостатньо досліджені, а доступні дані розрізнені, та фрагментарні. Питання впливу інертних газів на культивування МСК є майже невисвітленим у світовій науковій літературі.

Таким чином, доцільним постає питання більш поглибленого, детального та систематизованого дослідження можливості оптимізації культивування МСК-ВС шляхом застосування фізіологічних концентрацій кисню, із використанням газових сумішей не лише на основі азоту, але й інертного газу аргону.

Незважаючи на високий рівень та критичний аналіз наведеного літературного огляду, слід зазначити деякі недоліки.

Зокрема: підрозділи не об'єднані загальною ідеологією, яка б свідчила за ряд недостатньо висвітлених питань в світовій літературі, або ж питань спірного характеру, які покладені в основу мети та завдань проведеного власного дослідження.

В цілому, огляд літературних даних свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в обраній галузі досліджень, критичне відношення до опублікованих результатів, здатність виокремлювати та узагальнювати головне з масиву розрізнених літературних відомостей.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» складається з 8 підрозділів, де наведено експериментальні моделі, методичні підходи та схеми досліджень. детально описано всі використані реагенти, етапи проведеного дослідження, та об'єм роботи на кожному етапі. Наведено опис комплексу розробленого обладнання для створення газових сумішей із заданими параметрами, та схем культивування. Наведено та охарактеризовано розроблені в ході дослідження протоколи отримання первинних культур та культивування МСК-ВС, методики оцінки отриманих результатів. Автором детально представлено оптимізовані схеми вимірювання морфометричних показників для культур МСК-ВС.

При аналізі даного розділу виявлено деякі недоліки та виникли зауваження:

У підрозділі 2.2.4. Оцінка метаболічної активності культури МСК-ВС варто було більш детально розписати МТТ-тест – субстратом до яких ферментів є дана сіль і якого перетворення зазнає в живих клітинах і чому власне може даний метод бути віднесеним до визначення метаболічної активності культивованих клітин.

2.4. Дослідження проліферативних характеристик МСК-ВС за умов помірної гіпоксії – даний підрозділ потребує більшої деталізації, оскільки оцінювали подвоєння популяції лише через 7 днів після пасажу, а чому власне такий термін було відібрано? В інших дослідженнях у Вас зазначено культивування протягом 3 днів і подальшою оцінкою морфометричних чи метаболічних параметрів? І чи оцінювали Ви життєздатність клітин на різних пасажах? Які клони за розмірами на Вашу думку були достатніми для пасування?

Підрозділ 2.5. Отримання субпопуляцій МСК шляхом збереження клітин, що спонтанно відкріпились варто було б більш детально описати з обґрунтуванням такого підходу. Клітини, які відкріпились перебували в фазі мітозу, чи можливо ця субпопуляція характеризувалась клоногенними властивостями як субстрат-незакріплена?

Також слід було б зазначити, з якою метою проводилась трансфекція культур МСК-ВС. Підрозділи експериментальних процедур, пов'язаних із трансфекцією варто було об'єднати і додати хоча б одну роз'яснюючу фразу щодо даного експерименту.

А загалом **Розділ 2** свідчить про досконале володіння автором сучасних біотехнологічних, молекулярно-біологічних та культуральних методів дослідження, які виконані на достатньо високому технологічному та науковому рівні. Деякі методи, зокрема морфометричний представлено в авторській модифікації, який дозволяє отримувати більш детальну інформацію щодо структури МСК-ВС, асоційованої з їх функціями

Розділ 3. Результати власних досліджень складається із **п'яти підрозділів**. В **підрозділі 3.1.** детально описано розроблені дисертантом у співавторстві дві моделі створення газових сумішей зі зниженим вмістом кисню. Кожна із згаданих моделей складалась з двох "блоків": системи створення газової суміші, та контейнеру для культурального посуду. Детально описано та проілюстровано компоненти згаданих систем, та особливості роботи з ними. Також, описано оптимізовану двокомпонентну "конструкцію" контейнера для вміщення культурального посуду: посуд з культурою вміщували в пакет з герметичною застібкою, який, після наповнення вміщували у вакуумний контейнер. Зазначено спосіб підтримання оптимальної вологості у згаданій системі. Наведено дані щодо тривалості збереження заданої концентрації газів та підтримання температури у процесі використання систем. У підсумку **розділу 3.1** зазначено можливість створення простих та ефективних систем з

мінімальною кількістю компонентів.

Оскільки відомо, що отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів має низку переваг порівняно із ферментативними методами, проте потребує оптимізації через незначну кількість клітин, яку можна отримати в такий спосіб, автором висувається наступне завдання, яке досліджується в **підрозділі 3.2.** присвяченому дослідженню можливості застосування умов помірної гіпоксії для оптимізації отримання та мультиплікації первинних культур МСК-ВС. **Підрозділ 3.2.** поділяється на декілька логічних частин. В **пункті 3.2.1.** описано розроблену оптимізацію отримання МСК-ВС методом експлантів за стандартних умов CO₂-інкубатора. Автором встановлено, що пупкові канатики значно варіюють за морфологічними особливостями діаметром поперечного перерізу канатика, щільністю та кольором Вартонова студня, особливостями судин та наявністю нетипових елементів будови - наприклад, "петель", утворених судинами, ділянок з надлишковою кількістю гелеподібного студню тощо. Тому, у даному підрозділі описано розроблений автором з урахуванням виявлених особливостей універсальний протокол отримання МСК з ВС, що можна застосовувати незалежно від особливостей ВС. Описано встановлену гетерогенність за часом появи адгезивних клітин, їх початковій кількості залежно від особливостей донора. Усі отриманні дані зумовили необхідність розробки нових методичних підходів для виконання основного завдання підрозділу: дослідження застосування умов помірної гіпоксії для підвищення ефективності отримання первинної культури МСК-ВС. В **пункті 3.2.2.** описано і проілюстровано розроблену схему відбору фрагментів ВС в експериментальні та контрольні групи, і наведено результати отримання первинних культур МСК-ВС за стандартних умов CO₂-інкубатора та в умовах помірної гіпоксії, в газовій суміші, що містила 3% кисню, 5% вуглекислого газу та 92% азоту. Встановлено, що після 17 днів культивування клони клітин у популяціях, культивованих при 3%

кисню, мають більший розмір. При цьому, клітин з атиповою морфологією не було виявлено. Також, описано виявлену гетерогенність у інтенсивності утворення формагану в МТТ-тесті, у трьох незалежних дослідах, в яких використовувався матеріал від різних донорів. У підсумку вказано, що отримання первинних культур МСК-ВС методом експлантів в умовах помірної гіпоксії дозволяє збільшити кількість отриманих клітин.

Підрозділ 3.3 присвячено наступному завданню дисертаційної роботи, а саме дослідженню особливостей проліферації МСК-ВС в умовах помірної гіпоксії. Враховуючи відомі з літератури дані про цитопротективний ефект інертних газів, в тому числі і аргону, окремим завданням стала перевірка ефективності застосування газової суміші зі зниженим вмістом кисню, створеної на основі аргону. В **пункті 3.3.1.** наведено результати культивування МСК-ВС в газових сумішах, що містили 3% кисню, створених на основі азоту та аргону. Автором встановлено, що, порівняно з контрольною групою, яку було культивовано в стандартних умовах CO₂-інкубатора, на п'яти досліджених пасажах, кількість клітин при 3% кисню була більшою. Підвищення проліферативної активності клітин у суміші на основі азоту виявились більш вираженим. Визначення кількості поділів популяції підтвердило ці результати. Також, автором було виявлено, що рівень експресії поверхневих маркерів, типових для МСК, у контрольних та експериментальних групах практично не змінився, порівняно з нульовим пасажем.

Окремим цікавим результатом є розроблена оптимізація культивування МСК-ВС, шляхом отримання життєздатних культур шляхом відбору з кондиціонованого середовища клітин, які спонтанно відкріпились від субстрату, та їхньої мультиплікації, та отримані дані щодо впливу культивування при 3% кисню, у суміші на основі азоту та аргону, на такі культури МСК-ВС. Автором встановлено, що рівень проліферації МСК-ВС за 3% кисню, у обох газових сумішах, у всіх експериментальних варіантах

була достовірно вищим, при чому позитивний ефект суміші на основі аргону був більш вираженим.

Підрозділ 3.4. присвячено дослідженню особливостей морфології МСК-ВС, на різних етапах культивування, в умовах помірної гіпоксії. Визначені автором коефіцієнти варіації за морфометричними показниками, ядерно-цитоплазматичним співвідношенням та відношенням ширини клітини до її довжини дозволили встановити, що ступінь морфологічної гетерогенності МСК-ВС на різних пасажах відрізнявся: найвищий рівень морфологічної гомогенності було виявлено на другому пасажі. МСК-ВС, культивовані в газових сумішах при 3% кисню, на всіх пасажах виявились менш гетерогенними, ніж культури в стандартних умовах CO₂-інкубатора. Автором також встановлено, що кількість клітин з фенотипом, старіючих клітин, та кількість клітин, що виявляють активність асоційованої зі старінням бета-галактозидази, у популяціях, культивованих при 3% кисню, була меншою, ніж у культурах зі стандартних умов CO₂-інкубатора.

Оскільки автором було виявлено позитивний вплив умов помірної гіпоксії на проліферативні та морфологічні особливості культури МСК-ВС, наступним завданням, і етапом досліджень стала оптимізація невірусної трансфекції МСК-ВС за фізіологічних концентрацій кисню. Результати досліджень наведено у **підрозділі 3.5.** У низці дослідів автором було застосовано культивування МСК-ВС при 3% кисню, у сумішах на основі азоту та аргону, до та після процедури трансфекції за допомогою нанорозмірних поліплексів (полікатіонних носіїв та плазмідної ДНК із маркерним геном зеленого флюоресцентного білку eGFP). Отримані дані свідчать, що незважаючи на виявлену гетерогенність ефективності трансфекції у різних дослідах, у середньому, відсоток eGFP-позитивних клітин, був більшим в середньому у 2,6 рази в суміші на основі азоту, та 1,37 рази в суміші на основі аргону, порівняно зі стандартними умовами CO₂-інкубатора. також, особливо слід відзначити виявлену автором різницю

у ефектах газових сумішей.

Проте, при аналізі даного розділу виникло ряд запитань та зауважень

Згідно яких вимірів Ви проводили моніторинг за співвідношенням газів в камері культивування МСК-ВС? Які датчики при цьому використовувались?

Наскільки оптимізовано Вами було проведено видалення із пупкового канатика судин і якими методами Ви оцінювали відсутність в подальшому в культурах ендотеліальних клітин або їх попередників?

Ви зазначаєте, що оскільки в подальших дослідках використовували культури другого пасажу, оцінку популяції на предмет експресії поверхневих маркерів МСК проводили безпосередньо після першого пасажу, проте на рис.3.9. наведено дані щодо експресії поверхневих маркерів, 0 пасажу

Чи аналізували Ви фенотип так званих окремих округлих клітин, які відкріплялись від субстрату, а при внесенні в свіже культуральне середовище прикріплялись, розпластувались і формували моношар. Можливо, це мітотичні клітини, а можливо це був ефект зумовлений контактним гальмуванням проліферації клітин?

У Вас наведено різні терміни між пасажами. Чи порівнювали Ви ефективність досягнення конфлюенту за вмісту газів в умовах нормоксії, помірної гіпоксії, та суміші кисню на основі азоту та аргону?

І знову ж таки, щодо МТТ-тесту – поверхнево описані результати, без деталізації про що свідчить оптичне поглинання відмінне в групах – про активність мітохондріальних дегідрогеназ в розрахунку на кількість живих клітин, пов'язано з різним вмістом кисню, чи можливо зі збільшенням кількості клітин, що може свідчити за проліферативні процеси?

При підрахунку клітин в камері Горяєва, ви оцінювали життєздатність за відсотком мертвих клітин при різних співвідношеннях газових сумішей? Чи фіксували Ви цитотоксичні/цитостатичні ефекти за різних умов?

Незважаючи на наведені запитання та зауваження даний розділ добре структурований, містить різнобічні дані щодо оптимізації та модифікації

газовими сумішами умов культивування МСК-ВС, деякі із них отримані вперше згідно авторській інтерпретації стандартних та оригінальних підходів, які покладено в основу фахових публікацій в міжнародних та вітчизняних виданнях

У розділі 4 “Узагальнення та аналіз отриманих результатів” автор узагальнює та детально аналізує отримані дані щодо практичного значення виявлених особливостей Вартонова студня у різних донорів, для отримання первинних культур МСК-ВС, і порівнює їх з даними інших дослідників, незважаючи на недостатність описаних в літературі даних. Враховуючи описані в літературі механізми позитивного впливу умов помірної гіпоксії для МСК з різних джерел, автор детально аналізує власні дані, і висловлює припущення щодо потенційних причин, які могли б пояснити отримані дані щодо підвищення кількості МСК-ВС при введенні їх в культуру методом експлантів за фізіологічних концентрацій кисню, та отримані результати щодо гетерогенності у показниках МТТ-тесту у культурах, отриманих від різних донорів.

В даному розділі автор також піддає детальному та критичному аналізу результати власних досліджень щодо виявленого підвищення проліферативної активності у культурах МСК-ВС в умовах помірної гіпоксії, наводить припущення про потенційні механізми таких ефектів. Окремо дисертант піддає детальному аналізу отримані результати щодо впливу аргону на як компоненту газової суміші для культивування МСК-ВС, та встановлену різницю у ефектах газових сумішей на основі азоту та аргону, порівнюючи з відомими з літератури фрагментарними даними щодо впливу інертних газів на культури клітин не-мезенхімального походження.

Також, на основі детального та критичного аналізу відомих даних щодо морфології як інтегрального показника стану культури, та особливостей процесів старіння МСК різного походження, автор

висловлює припущення про можливі механізми, які зумовлюють встановлені у даній роботі явища позитивного ефекту культивування МСК-ВС за фізіологічних концентрацій кисню, на запобігання прояву ознак старіння культури.

Незважаючи на те, що у даній роботі явище підвищення ефективності невірусної трансфекції МСК описане вперше, автор висловлює припущення щодо потенційних механізмів встановленого явища.

Підсумовуючи усі наведені у розділі матеріали, автор обґрунтовує доцільність застосування культивування за фізіологічних концентрацій кисню для збереження значущих біологічних властивостей культур МСК-ВС.

Наведені висновки відповідають меті та завданням, поставленим автором.

Перелік використаних джерел літератури містить 194 посилання українською та іноземними мовами, переважна більшість яких опублікована в останні 10 років.

Таким чином, дисертація Шувалової Надії Сергіївни «Оптимізація кисневого стану для культивування мезенхімальних стовбурових клітин з пупкового канатика людини» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних форумах та з'їздах. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано в 11 наукових працях, в тому числі 5 статей – в журналах, що входять до наукометричних баз (Google Scholar, PubMed/Medline, SCOPUS), 6 тез доповідей у матеріалах з'їздів, наукових конференцій, в тому числі, міжнародних.

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної

проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної проблеми, на які спирається автор. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

За позитивної оцінки, проведеної автором роботи можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації, таких як присутність в тексті дисертації в великій кількості граматичних та орфографічних помилок, русизмів, описок, невдалих перекладів з англійської мови та підписів до рисунків.

Більшість із недоліків та запитань було прокоментовано при аналізі розділів дисертаційної роботи, тому не вважаю за доцільне зупинятись на цих питаннях та зауваженнях повторно.

Таким чином, наведені недоліки та зауваження не знижують загального позитивного враження про роботу і дисертація Шувалової Надії Сергіївни «Оптимізація кисневого стану для культивування мезенхімальних стовбурових клітин з пупкового канатика людини» в цілому є завершеним актуальним самостійним дослідженням, виконаним на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та відповідністю висновків поставленим завданням. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, ілюстративними матеріалами, оформленням дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки. Автореферат дисертації достатньо повно та адекватно висвітлює її зміст.

8. Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Шувалової Надії Сергіївни на тему «Оптимізація кисневого стану для культивування мезенхімальних стовбурових клітин з пупкового канатика людини» представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія є закінченим науковим дослідженням. Робота відповідає вимогам пп. 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а здобувач Шувалова Надія Сергіївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Професор кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
д.б.н., проф.

Л.В.Гарманчук

