

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Шувалової Надії Сергіївни “Оптимізація кисневого стану для культивування мезенхімальних стовбурових клітин з пупкового кантика людини”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

З’ясування можливостей та перспектив застосування стовбурових клітин в регенеративній медицині належить до провідних напрямків сучасної біотехнології. Завдяки секреторним та імуносупресивними властивостям та відсутності етичних протиріч перспективним джерелом отримання стовбурових клітин визнано перинатальні мезенхімальні стовбурові клітини, зокрема – з Вартонова студня. Однак при цьому постає проблема оптимізації умов культивування цих клітин, що необхідно не тільки для збільшення їх кількості, але й для збереження ними терапевтичних характеристик та регенеративного потенціалу. Відомо, що культивування стовбурових клітин за стандартних умов CO₂-інкубатора пов’язане зі старінням культури, розвитком генетичної нестабільності та цілого комплексу порушень, що обумовлюють втрату регенеративного потенціалу. Обумовлено це надмірною концентрацією кисню, що за стандартних умов практично дорівнює атмосферній, однак значно переважає таку в тканинах, що призводить до гіпероксигенації клітинних культур з утворенням надмірних кількостей активних форм кисню. Тому розглянута робота, присвячена оптимізації кисневого стану для культивування мезенхімальних стовбурових клітин, видається актуальною як з науково-пізнавальної, так і з практичної точок зору.

Мета роботи - оптимізація методу отримання первинних культур та культивування мезенхімальних стовбурових клітин за рахунок створення фізіологічних концентрацій кисню – повною мірою відповідає темі і заперечень не викликає. Відповідно до поставленої мети сформульовано низку практичних завдань, що включали розробку методу створення сумішей зі зниженим вмістом кисню, на основі аргону та азоту та способу культивування в них мезенхімальних стовбурових клітин; оптимізацію методу отримання первинних культур мезенхімальних стовбурових клітин за досліджуваних концентрацій кисню; оцінку впливу складу газових сумішей на проліферативну активність мезенхімальних стовбурових клітин протягом пасування культури; оптимізацію методу оцінки морфологічних особливостей культури клітин, визначення впливу гіпоксичних умов на морфологічні риси та особливості процесів старіння досліджуваних культур мезенхімальних стовбурових клітин. Подібна

деталізація також видається обґрунтованою, виправданою і заперечень не викликає.

Дисертація побудована за традиційною схемою і містить огляд літератури, матеріали та методи, результати, обговорення результатів, висновки та список цитованої літератури. Наскільки можна судити з огляду літератури, автор належним чином ознайомила з станом проблеми. Методична частина також повною мірою відповідає поставленій задачі і містить широкий набір сучасних біотехнологічних, цитологічних та молекулярно-біологічних методів.

Внаслідок проведеної роботи отримано наукові та практичні результати, що являють собою вагомий внесок в біотехнологію та регенеративну медицину. Створено та перевірено придатність до культивування мезенхімальних стовбурових клітин гіпооксигенних газових сумішей на основі азоту та аргону. Вперше оптимізовано методику отримання первинних культур мезенхімальних стовбурових клітин методом експлантів та доведено технологічні переваги досліджуваних газових сумішей. Вперше визначено та оцінено проліферативну активність культур мезенхімальних стовбурових клітин, прокультивованих в створених газових системах, оцінено їх вплив на культивовані культури клітин, зокрема – на збереження їх проліферативного потенціалу та зниження кількості клітин з атиповим фенотипом. Вперше показано, що новостворені газові композиції сприяють оптимізації невірусної трансфекції мезенхімальних стовбурових клітин. Отримані результати істотно доповнюють існуючі знання про біологію МСК та вплив фізіологічних концентрацій кисню на виживаність і проліферацію МСК. Істотно розширено методичні підходи для оцінки життєдіяльності мезенхімальних стовбурових клітин, ефективності отримання їх первинних культур та морфологічної оцінки протягом культивування. Показано вплив помірної гіпоксії на ефективність трансфекції. Розроблено універсальний протокол отримання первинних культур мезенхімальних стовбурових клітин, що не залежить від особливостей донорів. Все це створює методичне підґрунтя для введення мезенхімальних стовбурових клітин в культуру та їх мультиплікації.

Можна впевнено говорити про успішне досягнення поставлених завдань. Статистична обробка результатів проведена на належному рівні і зроблені на їх підставі висновки видаються обґрунтованими і заперечень не викликають. Наукові здобутки роботи опубліковано в 5 статтях у фахових журналах, неодноразово доповідались на вітчизняних та міжнародних наукових з'їздах та конференціях.

Принципових зауважень до роботи немає. Щоправда, хотілось би отримати відповідь на наступні питання:

- При обговоренні ролі над фізіологічних концентрацій кисню неодноразово згадувалось утворення активних форм кисню, що ушкоджують клітинні культури мезенхімальних стовбурових клітин. Чому ця ушкоджуюча дія не розглянута більш ретельно, обмежившись однією лише її згадкою?

- Відомо, що стовбурові клітини є виключно лабільними структурами, що зазнають ушкодження під впливом найрізноманітніших факторів. Чи правомірно зводити вплив утворених за гіпероксигенації активних форм кисню до одного лиш ушкодження ДНК? Як відомо, білкові компоненти зовнішньої клітинної мембрани – в першу чергу різноманітні рецепторні системи – також можуть зазнавати ушкоджень з подальшою деградацією клітин. Що автор може скахати з цього приводу?

- В роботі показано перевагу гіпооксигенних композицій на основі азоту порівняно до таких на основі аргону. Чи існує якийсь пояснення цієї відмінності? Відомо, що розчинність аргону в воді вдвічі перевищує таку у азота. Чи могла б ця різниця якось вплинути на виявлені автором ефекти?

Як видно, наведені питання не впливають на високу оцінку роботи в цілому. Вважаю, що розглянута дисертаційна робота є цілісною, закінченою науковою працею, що повною мірою відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор - Шувалова Надія Сергіївна - заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент - завідувач лабораторії біохімії
ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С.Коломійченка НАМН України»,
доктор біологічних наук, професор *В.В.В.* Верьовка С.В.

Підпис *Верьовки С.В.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. відділом кадрів *С.В.С.*

