

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Огієнко Світлани Леонідівни
«Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за
різних функціональних станів печінки», подану
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Інтерес до дослідження механізмів старіння пов'язаний не тільки з потенційною можливістю збільшення тривалості життя, але й з розумінням особливостей формування патологій, які залежать від віку та змін метаболізму. Первинні культури клітин кісткового мозку, які отримані у молодих та старих тварин, можуть бути адекватною моделлю у вивченні взаємного впливу різних метаболічних процесів у ході старіння. Одним з підходів у зміні мікрооточення клітин кісткового мозку в системі *in vivo* є зміна функцій печінки. Як відомо, за розвитку фіброзу печінки змінюються функціональні властивості кісткового мозку. Вивчення характеристик кісткового мозку, а також направленості диференціювання клітин на фоні розвитку фіброзу, представляє великий інтерес як для фундаментальних процесів розуміння функцій клітин кісткового мозку, так і для практичної медицини.

Контролювати стан мікрооточення клітин кісткового мозку є достатньо складним методичним завданням. Перш за все, це пов'язано з тим, що воно динамічно змінюється, по-друге, мікрооточення – комплекс декількох типів клітин стромы, білків позаклітинного матриксу, а також величезної кількості біологічно активних сполук, таких як цитокіни (декілька десятків), продукти деградації клітин (зокрема, вільно-радикальних реакцій), іонний склад, який також динамічно змінюється. Автор дисертаційної роботи використовував інтегральний біологічний підхід при вирішенні цієї актуальної мети.

Відомо, що у процесі старіння змінюється комплекс регуляторних факторів у крові, іонний склад, а також збільшується кількість продуктів деградації молекул. Дослідження «поведінки» клітин кісткового мозку у молодих і старих тварин може розглядатися як обґрунтований методичний підхід у вирішенні цього складного завдання. Для того, щоб урахувати ці особливості, у роботі використана можливість інтегральної зміни характеристик мікрооточення шляхом індукції фіброзу печінки у молодих і старих тварин. Можна зробити висновок, що дисертаційна робота Огієнко Світлани Леонідівни, яка присвячена деяким характеристикам клітин кісткового мозку у тварин різного віку, за урахування особливостей печінки, є обґрунтованою та актуальною.

Зв'язок теми з державними і галузевими програмами.

Дисертаційну роботу виконано у рамках науково-дослідних робіт НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна згідно планів НДР № 0115U000502 «Отримання, скринінг та оцінка антиоксидантних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікроводоростей» (здобувач – виконавець); НДР № 0115U000486 «Розробка теорії експериментальної

регуляції тривалості онтогенезу» (здобувач – виконавець).

Наукова новизна одержаних результатів. На різних моделях (старіння, різні форми фіброзу печінки, вплив компонентів молозива) було показано вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на патерн морфотипів клітин кісткового мозку, їх проліферативну активність та «тривалість життя» клітин кісткового мозку у первинній культурі. Зміна поведінки клітин кісткового мозку у культурі корелювала зі змінами таких фізико-хімічних характеристик клітин кісткового мозку, як вміст іонів кальцію, іонів міді та вільних форм кисню. Реакція клітин кісткового мозку на зміну мікрооточення, яка була викликана індукованими патологіями печінки, залежить від віку тварин, тобто вік впливає на фізико-хімічні та функціональні характеристики клітин кісткового мозку. Показано, що розвиток фіброзу печінки має виражений вплив на характеристики клітин кісткового мозку; це залежить від індуктора фіброзу печінки (купрум сульфат та чотирьоххлористий вуглець). Розвиток Cu-індукованого фіброзу печінки супроводжується пригніченням швидкості росту клітин у первинній культурі, які були отримані у молодих тварин. У той час, як клітини кісткового мозку, які були отримані у старих тварин та переведені у первинну культуру, зберігали проліферативну активність, хоча відставали від контролю, якщо порівнювати їх з молодими тваринами. Показано, що фіброз печінки, індукований введенням чотирьоххлористого вуглецю, викликав іншу вік-залежну відповідь на рівні клітин кісткового мозку. Показано взаємозв'язок між вмістом іонів міді, кальцію, вільних форм кисню та проліферативною активністю клітин кісткового мозку. Слід зазначити, що на ці показники впливав вік тварин та стан їх печінки.

Практичне значення і перспектива роботи полягає у розробці альтернативної експериментальної моделі гепатотоксичності, яка індукована введенням купру сульфату, що може мати переваги перед відомою моделлю індукції вільнорадикальної патології за допомогою чотирьоххлористого вуглецю. Запропоновано схему корекції гепатотоксичності з врахуванням вікового статусу. Результати дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес на біологічному факультеті Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці практичних робіт з дисциплін «Клітинні технології» для студентів біологічного факультету, які навчаються за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» на першому (бакалаврському) рівні освіти кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації.

Дисертація виконана на достатньому обсязі експериментального матеріалу із дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, забезпеченням адекватних контролів, використанням методів біохімічного аналізу, які адекватні меті та задачам роботи та інформативні. Результати досліджень статистично опрацьовані та достовірні. Наукові положення обґрунтовані, висновки відповідають поставленим задачам та змісту роботи, а також повністю відображають результати.

Матеріали дисертаційної роботи у повному обсязі відображено у 5 статтях, які надруковано у фахових виданнях з біологічних наук, з них 3 статті - у наукових періодичних виданнях, включених до наукометричної бази *Scopus*. Матеріали дисертаційної роботи доповідались на наукових конференціях національного та міжнародного рівня (6 тез доповідей). Здобувачеві належить суттєвий внесок у плануванні експерименту, його виконанні, опрацюванні наукової літератури та отриманих результатів.

Структура роботи. Дисертаційну роботу С. Л. Огієнко викладено за класичною схемою на 150 сторінках комп'ютерного набору, з яких 110 стор. основного тексту. Вона побудована за традиційною схемою: складається зі вступу (стор. 18-24), аналітичного огляду літератури (стор. 25-47, 20 %), матеріалів і методів дослідження (стор. 48-57), результатів й обговорення (стор. 59-119), завершується шістьма висновками та списком використаної літератури (224 найменування). Співвідношення та обсяг окремих частин роботи відповідають вимогам до оформлення дисертації, затвердженим МОН України. Результати роботи проілюстровано 30 рисунками.

Аналіз змісту дисертаційної роботи. У Вступі автор, на підставі критичного аналізу джерел літератури, обґрунтовує актуальність дослідження зміни кількості клітин кісткового мозку, а також їх спрямованості диференціювання за впливу патологічних станів печінки, відмінності у адаптаційному потенціалі систем детоксикації печінки залежно від віку та доцільність апробування препаратів біологічного походження з антитоксичною активністю для корегування патологічних станів печінки. Дисертант коректно формулює мету і задачі, об'єкт і предмет дослідження. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

Огляд літератури присвячено аналізу кількісних змін, які відбуваються у клітинах кісткового мозку залежно від віку (1.1.1), а також за умов інтоксикації печінки (1.1.2). Крім того, наведено дані щодо особливостей диференціювання стовбурових клітин кісткового мозку (1.1.3), а також впливу окислювального стресу на швидкість та проліферацію клітин кісткового мозку (1.1.4). Слід зазначити, що у огляді літератури розглянуто вплив мікрооточення клітин кісткового мозку на його функціональну активність (1.2). У розділі достатньо повно розглянуто інформаційні та методологічні засади дослідження з використанням сучасних та класичних наукових джерел. Позитивною рисою розділу є послідовна апеляція до результатів дослідження наукових колективів. У Висновку до розділу обґрунтовано перспективи власного дослідження, виходячи з наявного досвіду у галузі, а також логіки пошуку у науковому колективі. Загалом, вміст розділу свідчить, що автор добре орієнтується у науковій літературі та уміло систематизує інформацію.

У розділі «Матеріали і методи дослідження» подано схеми проведення експерименту та детальний опис методів дослідження. Опис груп свідчить, що дослідження проведено з використанням двох вікових груп щурів (3-х міс. та 20-ти міс.), кожна з яких

включала коректні контролі, групу, яка отримували купрум сульфат (1 мг/100 г маси тіла), групу, яка додатково отримувала низькомолекулярні компоненти молозива, а також групу, яка отримувала чотирьоххлористий вуглець (0,1 мл). Дисертант використав фізіологічні методи дослідження для культивування клітин кісткового мозку, оцінки вмісту іонів кальцію та реактивних форм кисню у первинній культурі клітин. Крім того, було використано препаративні, цитологічні та спектрофотометричні методи дослідження. Обраний набір методів є достатнім для характеристики впливу мікрооточення клітин кісткового мозку на певні характеристики клітин кісткового мозку, за впливу змінених станів печінки, у первинній культурі. Розділ завершується узагальненням щодо робіт.

У розділі «Результати та обговорення» дисертант систематизує результати власних досліджень у відповідності до експериментальних серій. Результати та обговорення представлені у 4 підрозділах власних експериментальних досліджень, які проведені на високому науково-методичному рівні.

У підрозділі 3.1 автор наводить вік-залежні зміни характеристик, які відбуваються у клітинах кісткового мозку. Проліферативний потенціал клітин кісткового мозку, які були отримані у старих тварин, перевищував такий у молодих тварин на першу добу культивування в системі *in vitro*. Показано, що кісткових мозок старих тварин відрізняється за якісними і кількісними характеристиками клітин.

У підрозділі 3.2 послідовно доводиться, що кількість клітин кісткового мозку у первинній культурі, за впливу індукованого фіброзу печінки, змінюється. Було виявлено, що фіброз печінки викликав зміну розподілу восьми ідентифікованих морфотипів клітин кісткового мозку. Найбільші відмінності між молодими та старими тваринами виявлялися у вмісті лімфоцитів. Крім того, виявлено, що клітини кісткового мозку старих тварин менш чутливі до іонів міді, та для них була виявлена зворотна дозова залежність, як для інтактних, так і для тварин з фіброзом печінки.

Доведено позитивний вплив низькомолекулярних компонентів молозива на патерн морфотипів клітин кісткового мозку, «тривалість життя» клітин, а також на зміну кількості клітин кісткового мозку у тварин з інтоксикацією купрум сульфатом (підрозділ 3.3). У підрозділі 3.4 показано можливий взаємозв'язок іонного складу клітин кісткового мозку, отриманих у тварин різного віку, з їх проліферативною активністю. Ці та інші наведені результати свідчать про ефективність застосованих потенційних антидотів та дають підстави для їх застосування у різних вікових групах. Висновок до Розділу 3 (стор. 117-119) узагальнює та аналізує результати дослідження. Автор формулює шість висновків, які загалом відображають сутність отриманих результатів і відповідають поставленим задачам.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення

Принципових недоліків у роботі мною не виявлено, але є низка питань дискусійного характеру та зауважень.

Питання:

1. Не зрозуміло, що автор має на увазі, використовуючи термін "мікрооточення" гемопоетичних клітин кісткового мозку: клітини стромы, позаклітинний матрикс, ростові фактори, цитокіни, тощо? Чи можна більш конкретно сформулювати цей термін?

2. При багаторазовому введенні *per os* чотирьоххлористого вуглецю та сульфат купруму їх токсична дія поширюється не тільки на печінку, а й на інші органи і тканини. Виникає питання: як цей факт враховується при дослідженні клітин кісткового мозку?

3. Тривалість життя клітини генетично запрограмована і для визначення потребує використання специфічних методів. Тому вважаю, що застосування цього терміну, хоча і в лапках, не є коректним. Тим більше, що в роботі досліджується динамічна ситуація, коли неідентифіковані клітини-попередники в перебігу проліферації дорослішають і стають ідентифікованими. Як такі клітини, які проліферують, враховуються при визначенні "тривалості життя"?

4. В роботі виявлена дуже суттєва різниця у кількості іонів кальцію (на 73 %) та міді (в 5 разів) у кістковому мозку молодих та старих щурів. Така різниця, отримана для достатньо стабільних показників іонного складу клітин, потребує обговорення. Питання: чи відповідають отримані чисельні значення даним літератури?

Зауваження та рекомендації:

1. В обзорі літератури доцільно було б привести дані щодо впливу патологічних станів (в тому числі печінки) на властивості клітин кісткового мозку.

2. В розділі "Методи" автореферату не наведені методи приготування та застосування низькомолекулярних компонентів молозива.

3. В роботі визначали кількість ідентифікованих гемопоетичних клітин, а також неідентифікованих морфотипів кісткового мозку. До останньої групи відносяться гемопоетичні клітини-попередники, а також стромальні клітини різної природи та ступеню диференціювання. Відомо, що стромальні клітини відрізняються від гемопоетичних властивістю адгезувати до культурального пластика. Цю властивість було б доцільно використати для ідентифікації пулу стромальних клітин. Нажаль, таку можливість автор не використовував.

4. Дуже широке "філософське" узагальнення роботи з поясненням отриманих результатів епігенетичними та метаболічними механізмами видається більш відповідним до монографії (бажаю, щоб така була написана). Але в кандидатській дисертації більш доцільно було б обговорити можливі конкретні сполуки (цитокіни, ростові фактори, тощо), які передають сигнали з патологічно зміненої печінки до кісткового мозку та механізми їхньої дії.

5. Природно, що в тексті дисертації є і помилки, і невдалі вислови, на яких я не зупиняюсь.

Ці недоліки не мають, однак, принципового значення і не знижують високої наукової і практичної цінності роботи.

Висновок про відповідність

Дисертація С. Л. Огієнко є завершеною експериментальною роботою, яку відзначає послідовність у вирішенні конкретного питання фізіології – встановлення впливу мікрооточення, яке було змінено індукованим фіброзом печінки та віком тварин, на характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі. Матеріали дисертаційної роботи надруковані у п'яти міжнародних індексованих журналах, з яких є у наукометричних базах даних Scopus. Крім того, матеріали доповідалися на різних міжнародних конференціях та отримані високу оцінку.

На основі вищезазначеного вважаю, що кандидатська дисертація Огієнко Світлани Леонідівни «Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за різних функціональних станів печінки» за актуальністю проблеми, методичними підходами, практичною цінністю та науковою новизною отриманих результатів є завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам п.п. 9,11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ N 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ №656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016 р.) щодо оформлення результатів та їх аргументованої оцінки, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Завідувач відділу кріобіохімії
Інституту проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України,
доктор біологічних наук, професор



О. Ю. Петренко

