

## ВІДГУК

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

### **1. Актуальність обраної теми.**

Механізми старіння є вкрай складними і проявляються гетерохронно на різних рівнях організації функціональної системи організму. Багато питань з вирішення даної проблеми успішно розвиваються в області геронтології. Створено ряд теорій та концепцій, але механізми взаємодії метаболічних процесів та факторів мікрооточення за умов старіння організму практично не вивчені. Дослідження цих питань дозволило б віддиференціювати прояви вік-залежних адаптивних відповідей від дезадаптивних патологічних реакцій. У зв'язку з цим, мета дисертаційного дослідження С. Л. Огієнко «Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за різних функціональних станів печінки» є надто актуальною як для геронтології, так і для геріатрії.

### **2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційні наукові дослідження проводилися протягом 2015-2018 рр. в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна згідно планів НДР: № 0115U000502 «Отримання, скринінг та оцінка антитоксичних властивостей низькомолекулярних субстанцій з мікроводоростей»; № 0115U000486 «Розробка теорії експериментальної регуляції тривалості онтогенезу».

### **3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Дисертаційна робота С. Л. Огієнко «Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за різних функціональних станів печінки» є закінченим науковим дослідженням, яке виконане на достатній кількості тварин (192 щура-самця лінії Wistar) двох вікових груп – молодих (3-місяці) і старих (20 місяців). Основні положення і висновки, сформульовані автором, викладені на основі поглибленого аналізу зарубіжних та вітчизняних джерел літератури, результатів власних досліджень та їх обговорення. Вищесказане дозволяє оцінити отримані результати наукових досліджень, основні наукові положення, висновки як обґрунтовані.

### **4. Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.**

Сформульовані С. Л. Огієнко основні наукові положення та висновки ґрунтуються на використанні адекватних вік-залежних клітинних моделей із залученням біохімічних, цитологічних і статистичних методів досліджень функціонального стану

клітин кісткового мозку. Перелічене вище дозволяє оцінити отримані результати, основні наукові положення та висновки глибоких за змістом досліджень, проведених С. Л. Огієнко, як вірогідні. Дослідження проводилися з дотриманням принципів біоетики, відповідно до вимог положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, згідно відповідних законів України та підтверджені біоетичною комісією НДІ біології ХНУ імені В. Н. Каразіна (протокол № 5 від 16.05.2019).

#### **5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів.**

Новизна представленої роботи полягає в тому, що на клітинній моделі кісткового мозку за умови природного старіння та при патології (різноманітні моделі фіброзу печінки) показано вплив мікрооточення на функціональну активність кісткового мозку, а зміна характеристик мікрооточення для клітин кісткового мозку, отриманих у молодих і старих інтактних щурів, супроводжувалася зміною таких фізико-хімічних характеристик, як вміст іонів Cu, Ca та вільних форм кисню, що змінювало проліферативну активність у цих клітинах. На моделях патології печінки вперше показано вік-залежний вплив індуктора фіброзу (сірчанокисла мідь, 4-хлористий вуглець) на проліферацію клітин кісткового мозку у первинній культурі. Встановлено дозо-залежну відповідь до дії сірчанокиислої міді клітин кісткового мозку молодих і старих тварин. Також вперше показано стимулюючий вплив низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива на проліферативну активність клітин кісткового мозку за умов Cu-індукованого фіброзу печінки.

#### **6. Практичне значення отриманих результатів.**

Результати проведених досліджень сприяють розробці нових біологічних підходів щодо стимуляції низькомолекулярними компонентами коров'ячого молозива адаптивних механізмів організму за умов старіння та при патології. Матеріали дисертації впроваджені у навчальний процес кафедри молекулярної біології та біотехнології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

#### **7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях та авторефераті.**

Дисертант є автором 11 наукових праць, з них: 5 статей у зарубіжних фахових виданнях (серед них 3 статті, що входять до наукометричної бази Scopus).

#### **8. Структура дисертації.**

Дисертаційна робота С. Л. Огієнко викладена на 150 сторінках машинописного тексту, її структура відповідає вимогам ДАК МОН України, включає: анотацію (написану українською та англійською мовами), вступ, огляд літератури, два розділи власних досліджень, висновки, список використаних джерел (в кількості 224, переважно англомовних), рисунки, 3 додатки.

У вступі автор формулює актуальність теми, надає глибоке обґрунтування функціональних властивостей обраної вік-залежної клітинної моделі, визначає мету, завдання, методи досліджень, наукову новизну і практичне значення отриманих результатів.

В огляді літератури, який складається з 2-х підрозділів, представлено системний аналіз літературних джерел щодо сучасних уявлень про вікову структурно-функціональну організацію кісткового мозку. Значну увагу автор приділяє мезенхімальним та гемопоетичним стовбуровим клітинам, їх проліферативним і диференційованим вік-залежним властивостям, ролі гемопоетичного індукуючого мікрооточення. Зроблено акцент на репаративному впливі стовбурових/прогеніраторних клітин на структуру та функції пошкодженої печінки. Детально викладені шляхи репрограмування відновлювальних процесів.

Розділ роботи написаний творчо, має узагальнюючий характер і свідчить про знання сучасного стану проблеми, що дозволило дисертанту виявити ряд питань, які потребують подальшого визначення. Це стосується таких питань, як вплив мікрооточення на функціональну активність кісткового мозку в різні періоди онтогенезу та за умови дисфункції печінки і протекторного впливу низькомолекулярних білків, що і стало метою дисертаційного дослідження.

Розділ «Матеріал і методи дослідження» написаний кваліфіковано. Експериментальні дослідження проведені на біоматеріалі клітин кісткового мозку 192 щурів двох вікових груп – молодих (3-місячного віку) і старих (20-місячного віку). Обрані моделі фіброзу печінки є адекватними для вивчення впливу мікрооточення на функцію клітин кісткового мозку, зумовленого динамічними змінами компонентів крові, які залежать від функціонального стану печінки, та відображають основні патогенетичні ланцюги захворювань, наприклад, ураження печінки надлишком вільної міді при хворобі Коновалова-Вільсона.

Задіяний комплекс сучасних фізіологічних, біохімічних і цитологічних методів досліджень повністю відповідає вирішенню поставлених у роботі задач.

Власні дослідження викладені у 3-му підрозділі роботи, який включає 4 підрозділи. В першому підрозділі представлені вік-залежні зміни характеристик кісткового мозку у первинній культурі щурів. Автором встановлено важливі факти про те, що клітини кісткового мозку молодих і старих щурів відрізняються не лише інтенсивністю росту і тривалістю життя у первинній культурі, але й морфологічною ідентифікацією. При цьому характерним для клітин кісткового мозку старих щурів є висока (на першу добу культивування) інтенсивність росту і значно вища ідентифікація морфотипів з перевагою вмісту лімфоцитів у старих тварин над молодими та зменшеною кількістю морфологічно неідентифікованих стовбурових клітин. Тривалість життя молодих клітин кісткового мозку мієлоцитів та метамієлоцитів значно переважає у старих щурів.

Виникає запитання, чим зумовлені такі вік-залежні морфофункціональні зміни клітин кісткового мозку? Можливо, допускає дисертант, іонним складом клітин кісткового мозку тварин. Відповідь на це дали складні постановки досліджень із застосуванням методів атомно-адсорбційної фотометрії та флуоресцентної мікроскопії. Автором показано, що клітини кісткового мозку старих щурів мали значно більше іонів Са на відміну від молодих тварин, а міді – у 5 разів менше, що не пов'язано з типами диференціювання. Однак фізико-хімічні характеристики клітин, а саме – рівень вільних форм кисню істотно зменшений у клітинах кісткового мозку старих щурів та, як стверджує дисертант, свідчить про зміщення у системі «прооксиданти-антиоксиданти» у клітинах кісткового мозку старих щурів у бік прооксидантів.

У другому підрозділі дисертаційної роботи надано матеріали щодо дослідження впливу мікрооточення на вік-залежні характеристики кісткового мозку. Дослідження проведені за умов *in vivo* – при експериментальному фіброзі печінки та *in vitro* – при безпосередньому введенні токсикантів у культуру клітин кісткового мозку. Експериментальний фіброз печінки моделювали двома способами: введенням сірчаної кислоти міді (одна модель) і введенням 4-хлористого вуглецю (друга модель). Необхідно зазначити, що адекватність обраних моделей фіброзу печінки автором переконливо доведена методами біохімічної, імунологічної та гістологічної верифікації, результати якої наведені в таблицях, гістограмах та мікрофотографіях.

Отримано цікаві дані з приводу того, що індукція фіброзу печінки, незалежно від типу індуктора, викликала кількісні зміни ідентифікованих і неідентифікованих клітин кісткового мозку у молодих тварин зі збільшенням кількості неідентифікованих тварин, та їх співвідношення щодо ідентифікованих. А у старих щурів зміни були іншими і залежали від типу індуктора, а саме – від токсичної дії міді. У зв'язку з цим, автор ставить задачу з вивчення проліферативної активності клітин за умов *in vitro*, що дозволило з'ясувати вік-залежний вплив Си-індукованого фіброзу печінки на проліферативну активність клітин кісткового мозку, зумовлену складними взаємовідносинами між вихідним вік-залежним метаболічним станом клітин кісткового мозку та змінами мікрооточення.

Заслуговує на увагу, що розвиток Си-індукованого фіброзу печінки у молодих щурів призводить до пригнічення проліферативної активності клітин кісткового мозку в системі *in vitro*, а при дії 4-хлористого вуглецю проліферативна активність цих клітин збільшується, тоді як клітини кісткового мозку старих тварин за цих умов не втрачали здатності до проліферації.

Отримані факти дозволили дисертанту оцінити виявлені негативні ефекти токсичної дії міді та провести подальші дослідження щодо вивчення вік-залежних відповідних реакцій на екзогенний вплив міді в умовах норми та патології. Автором отримано принципово нові дані стосовно дозо-залежного пригнічення проліферативної

активності клітин кісткового мозку молодих тварин і зворотної дозо-залежності проліферативної активності у старих.

Надзвичайно цікавими є факти, що отримані у третьому підрозділі роботи «Дослідження вік-залежного впливу комплексу низькомолекулярних компонентів з коров'ячого молозива на деякі характеристики клітин кісткового мозку тварин з Суіндукованим фіброзом печінки». Як встановлено, коров'яче молозиво включає до 200 компонентів біологічно активних речовин, які сприяють стимуляції імунних, метаболічних і ростових процесів. Тому вкрай важливим являлося відокремлення зі всього комплексу біологічних компонентів молозива лише тієї фракції, яка містить низькомолекулярні компоненти, що відіграють важливу роль у підтримці процесів проліферації та диференціювання клітин і сприяють антиоксидантному захисту.

Дисертантка успішно впоралася з поставленою задачею з вивчення репаративних ефектів коров'ячого молозива, про що переконливо свідчать результати дослідження. З'ясовано, що 3-разове введення низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива викликає зміни мікрооточення клітин кісткового мозку і позитивно впливає на його функціональну активність. Отримані важливі факти властивостей коров'ячого молозива притаманні лише зрілим клітинам кісткового мозку – лімфоцитам, нейтрофілам, еозинофілам. Виявлено також дозо-залежні впливи коров'ячого молозива на клітини кісткового мозку.

Заслуговують на увагу експериментальні докази, отримані у 4 підрозділі роботи, про те, що компоненти мікрооточення клітин кісткового мозку старих і молодих тварин в умовах норми і патології печінки, в даному дослідженні – при фіброзі печінки, індукованому введенням сірчаної кислоти міді, впливають на такі фізико-хімічні характеристики, як: іони Са – вторинні месенджери регуляторних процесів, іони Су – коферменти багатьох ферментів та вільні форми кисню – показник редоксистеми організму, та змінюють проліферативну активність клітин кісткового мозку. Автор робить важливий висновок, що не вік тварин, а мікрооточення, викликане змінами функціональних систем організму, впливає на характеристики клітин кісткового мозку, що є одним з факторів вік-залежних патологій.

Розділ завершує концептуальна схема формування оптимальних вік-залежних стратегій адаптації. Ці погляди автора є вкрай важливими для розуміння фундаментальних основ вікових патологій.

Третій розділ завершений узагальненням отриманих результатів, в якому автор доводить, що кістковий мозок виконує складну інтегративну функцію організму, миттєво відповідає на зміни мікрооточення та є одним з регуляторів функціональних систем організму.

Основні положення дисертаційної роботи представлені шістьма висновками, які відображають отримані автором результати, дають відповідь на поставлені в роботі питання.

## 9. Недоліки дисертації та автореферату до їх змісту та оформлення.

Принципових зауважень до дисертації та автореферату немає. До недоліків необхідно віднести наступне:

1) У розділі «Матеріал і методи дослідження» не описано спосіб введення низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива, режим введення та дози, хоча у відповідних розділах роботи ця інформація представлена.

2) На наш погляд, застосування термінів «поведінка клітин», «поведінка системи» не є вдалим, тому що поведінка включає складні взаємовідносини тваринного організму з факторами довкілля.

Запитання щодо дисертаційної роботи, які носять дискусійний характер, але не впливають на її загальну позитивну оцінку:

1) Чим зумовлені, згідно епігенетичної теорії старіння, отримані в роботі дані щодо переважання проліферативної активності клітин кісткового мозку у старих інтактних щурів та в первинній культурі над проліферативною активністю молодих. Чи можна розглядати ці зміни як вік-адаптивні відповіді антистаріння клітин кісткового мозку за В. В. Фролькісом?

2) Які, на Вашу думку, низькомолекулярні компоненти коров'ячого молозива стимулюють проліферативну активність кісткового мозку? Чи ці агенти активні лише в складі низькомолекулярних компонентів коров'ячого молозива, чи вони можуть проявляти свою дію самостійно (у «чистому виді»)?

## Висновок

Дисертаційна робота С. Л. Огієнко «Вік-залежні характеристики клітин кісткового мозку у первинній культурі за різних функціональних станів печінки» є фундаментальним дослідженням, в якому на клітинній вік-залежній моделі кісткового мозку вивчено особливості взаємодій метаболізму та мікрооточення в нормі та при патології, що вносить вагомий вклад у проблему старіння. Дисертаційна робота відповідає всім вимогам п.10, п.13 «Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» (постанова Кабміну України № 567 від 24.07.2013), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

## Офіційний опонент

Зав. лабораторією нейрофізіології,  
імунології та біохімії  
ДУ «Інститут неврології, психіатрії  
та наркології НАМН України»,  
доктор біологічних наук, професор



Берченко О. Г.