

Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0421U101906

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 21-05-2021

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:



II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Шувалова Надія Сергіївна

2. Shuvalova Nadiia Serhiivna

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: кандидат наук

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 03.00.20

Назва наукової спеціальності: Біотехнологія

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 27-04-2021

Спеціальність за освітою: біологія

Місце роботи здобувача: Державна установа "Інститут генетичної та регенеративної медицини
Національної академії медичних наук України"

Код за ЄДРПОУ: 35310861

Місцезнаходження: вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 04114, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія медичних наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 26.237.01

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, м. Київ, 03143, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, м. Київ, 03143, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик:

Тема дисертації:

1. Оптимізація кисневого стану для культивування мезенхімальних стовбурових клітин з пупкового канатика людини
2. Optimizing the oxygen concentration for cultivation of mesenchymal stem cells from umbilical cord

Реферат:

1. Дисертація присвячена оптимізації культивування мезенхімальних стовбурових клітин Вартонова студня людини (МСК-ВС), шляхом застосування умов фізіологічних концентрацій кисню, та дослідженню впливу цих умов на життєдіяльність МСК-ВС. У результаті роботи розроблено схеми створення сумішей зі зниженим вмістом кисню, на основі аргону та азоту. Виявлено, що введення МСК-ВС у культуру методом експлантів за фізіологічних концентрацій кисню (3%) сприяє підвищенню кількості отриманих клітин, незалежно від особливостей тканини Вартонова студня. Встановлено, що кількість МСК-ВС, отриманих при 3% кисню, була на 28% більшою, порівняно зі стандартними умовами CO₂-інкубатора. Дослідження метаболічної активності у первинних культурах виявили значну гетерогенність між популяціями, отриманими від різних донорів. Інтенсивність утворення формагану в МТТ-тесті, в середньому, була на 35% вищою при

3% кисню, ніж в умовах CO₂-інкубатора, що відповідало більшій кількості клітин. Встановлено, що культивування при 3% кисню підвищує рівень проліферації МСК-ВС на всіх досліджених пасажах і не впливає на рівень експресії поверхневих маркерних білків. Також, було розроблено метод отримання культур МСК-ВС шляхом відбору клітин, які спонтанно відкріпились, з кондиціонованого середовища, та їхньої подальшої мультиплікації. Було встановлено, що характер проліферації у «побічних» культурах МСК-ВС, отриманих згаданим способом з нульового і першого пасажів, в стандартних умовах CO₂-інкубатора, загалом відповідав притаманному «основній» культурі, тоді як рівень проліферації «побічних» популяцій, отриманих з культур на другому пасажі, був суттєво нижчим. Для культур МСК-ВС "основної" та «побічних» ліній на 3 і 4 пасажах, отриманих з нульового та першого пасажів, кількість клітин з фенотипом, притаманним старіючим, була практично однаковою тоді у "побічній" лінії, отриманої з другого пасажу, була помітно більшою. Порівняння ефективності культивування МСК-ВС, отриманих згаданим методом, у газових сумішах на основі азоту та аргону, які містили 3% кисню показало, що кількість МСК-ВС в умовах помірної гіпоксії в усіх варіантах була вищою, ніж в стандартних умовах CO₂-інкубатора. На всіх досліджених пасажах МСК-ВС, культивовані в газових сумішах з 3% кисню, були більш гомогенними за морфологією та містили меншу кількість клітин з фенотипом, типовим для старіючих, у порівнянні з культурами з умов CO₂-інкубатора. Для всіх груп найвищий рівень морфологічної гомогенності можна було спостерігати на другому пасажі. В суміші на основі азоту культури були найбільш гомогенними і містили найменшу кількість МСК-ВС з фенотипом, притаманним старіючим клітинам. Показано значну гетерогенність у активності асоційованої зі старінням бета-галактозидази. У групах, культивованих при 3% кисню в суміші на основі азоту, цей показник був найнижчим. Вперше встановлено, що культивування та проведення процедури трансфікування МСК-ВС невірусними методами, за допомогою нанорозмірних поліплексів, у газових сумішах зі зниженим вмістом кисню (3%) сприяє підвищенню ефективності трансфекції. Відсоток процент МСК, які експресували маркерний білок, був більшим в середньому у 2,58 в суміші на основі азоту, та 1,37 рази в суміші на основі аргону. Розроблені в результаті роботи оптимізації мають позитивний вплив на життєдіяльність МСК-ВС в умовах *in vitro*. Вперше виявлено наявність різниці у ефектах газових сумішей, створених на основі азоту і на основі аргону.

2. The present PhD thesis is dedicated to the study of cultivation of mesenchymal stem cells from Wharton jelly (WJ-MSC) under physiologic oxygen concentrations. In present work, two systems for composing the gas mixtures with low oxygen concentrations, based either on nitrogen or argon, were developed and tested for cultivation of WJ-MSC. The obtaining of WJ-MSC primary cultures by explant method in gas mixtures with 3% oxygen showed, that the number and size of WJ-MSC colonies were higher under conditions of mild hypoxia, comparing to standard CO₂-incubator conditions. On average, the number of WJ-MSC in conditions of mild hypoxia was 1,27 fold higher. The study of metabolic activity of primary WJ-MSC cultures showed the high level of heterogeneity between populations, obtained from different donors. On average, the optical density in MTT-test was 1,35 fold higher under 3% oxygen, comparing to standard CO₂-incubator conditions. The study of WJ-MSC proliferative activity in gas mixtures, containing 3% oxygen, based either on nitrogen or argon, showed, that after 7 days of cultivation, at passages 1 to 5, the numbers of cells in WJ-MSC cultures maintained in 3% oxygen gas mixtures were larger, than in control group from standard CO₂-incubator conditions, even after slight decrease in proliferative activity after passage 3. No changes in MSC surface marker proteins were detected. We also developed the method of multiplication of WJ-MSC, spontaneously detached from substrate, presumably, before or during cell division. The study revealed that the proliferative activity in "side lines", obtained from spontaneously detached cells (SDC) at passage 0 and 1, was nearly similar to one of cultures, passed with trypsin-EDTA solution. The proliferation level in cultures, obtained from SDC collected on passage 2, appeared to be significantly lower, than that in the trypsin-EDTA passed line. We also found, that WJ-MSC cultures of "main" and "side" lines from 0 and 1 passage, contained similar numbers of cells with senescent phenotype at passage 3 and 4, while their numbers in "side line" from passage 2 was significantly higher. The study showed, that under 3% oxygen, the number of MSC-WJ in cultures, obtained from SDC, was higher comparing to the standard CO₂ incubator conditions. The analysis of WJ-MSC morphology revealed, that the degree of heterogeneity in nuclear-

cytoplasmic ratio and “width\length ratio” in cultures, changed during cultivation period. For all groups, the highest level of homogeneity was observed at passage 2. Comparing the effects of gas mixtures, the highest level of homogeneity was observed in nitrogen-based gas mixtures. We also showed the heterogeneity in the activity of senescence-associated β -galactosidase at passage 3 in all conditions. The lowest level of SA- β -gal activity was detected in nitrogen-based gas mixture. We also showed that the number of SA- β -gal was on average, greater, than the number of cells with flattened shape. In this study, the novel optimization for methods of non-viral WJ-MSC transfection was developed, by conducting all the stages of transfection procedure under physiological oxygen tensions. The transfection with nano-sized polyplexes containing plasmid DNA with marker gene (enhanced green fluorescent protein - eGFP), in gas mixtures with 3% oxygen, showed, that the percent of eGFP-positive cells was significantly higher under mild hypoxia, than in control group, maintained in standard CO₂-incubator conditions. In general, the number of eGFP-positive cells was 2,58-time higher in nitrogen-based mixture, and 1,37 in argon-based mixture, comparing to CO₂-incubator conditions. The present work showed the positive effect of mild hypoxic conditions on WJ-MSC cultures and is the first to reveal the difference in biological effects of gas mixtures, with nitrogen and argon as "base" component, on WJ-MSC.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Кордюм Віталій Арнольдович

2. Kordium Vitalii A.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.15

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Гарманчук Людмила Василівна
2. Garmanchuk Liudmyla Vasylivna

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.11

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Верьовка Сергій Вікторович
2. Verevka Sergii

Кваліфікація: д.б.н., 02.00.10, 03.00.04

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Півень Оксана Олександрівна
2. Piven Oksana O.

Кваліфікація: к. б. н., 03.00.22

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Колибо Денис Володимирович
2. Колибо Денис Володимирович

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.03

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VIII. Заключні відомості

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові
голови ради**

Єльська Ганна Валентинівна

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові
головуючого на засіданні**

Кунах Віктор Анатолійович

**Відповідальний за підготовку
облікових документів**

Реєстратор

**Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є
відповідальним за реєстрацію наукової
діяльності**



Юрченко Т.А.