

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Васильєва Романа Геннадійовича на тему “Морфофункціональні властивості мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з волосяного фолікула та біотехнологічні аспекти їх використання у регенеративній медицині”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки)

1. Актуальність теми

Розвиток методів тривалого культивування мультипотентних стовбурових клітин з експансією клітин-попередників є значним внеском у біотехнологію та регенеративну медицину. Однак, *ex vivo* експансія супроводжується безліччю складнощів. Ідеальна тривала культура включає репродукцію всіх етапів формування клітинних елементів. Культури, які підтримують клітинну продукцію на стабільному рівні впродовж тривалого часу з постійним самовідновленням стовбурових клітин, балансують між експансією та втратою клітин у результаті диференціювання та проліферації.

Як відомо, стовбурові клітини-похідні нервового гребеня *in vitro* демонструють здатність до самовідновлення та мультилінійного диференціювання у нейрони, Шваннівські клітини, меланоцити, адипоцити, остеобласти, хондроцити, та ін., тобто вони є мультипотентними стовбуровими клітинами-похідними нервового гребеня (мСК-ПНГ). Відносна доступність, мала інвазивність процедури забору волосяних фолікулів і можливість відтвореного отримання гомогенної клітинної культури роблять мСК-ПНГ з *bulge* регіону волосяного фолікула перспективним об'єктом для дослідження їх морфофункціональних властивостей і розробки способів їх застосування в області регенеративної медицини. Отже, метою роботи Васильєва Р. Г. є визначення морфофункціональних властивостей мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня у культурі *in vitro*, а також розробка біотехнологічних аспектів їх використання у регенеративній медицині за умови оцінки терапевтичного потенціалу на моделях ушкоджень *in vivo* і *in vitro*.

Відповідно до мети автором наведено до вирішення 5 завдань, які відповідають поставленій меті.

На основі вищезазначеного вважаю роботу Васильєва Р. Г. актуальною та важливою у теоретичному та практичному значенні.

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

Робота виконана у рамках комплексних наукових робіт ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»: НДР «Дослідження нейропротекторних властивостей стовбурових клітин при різних експериментальних моделях патології нервової системи» № держреєстрації 0113U000100 (2013-2015 рр); НДР «Роль клітинних та ендокринних факторів у реалізації нейропротекторних властивостей стовбурових клітин при експериментальних ушкодженнях нервової системи» № держреєстрації 0116U000139 (2016-2018 рр).

3. Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих в дисертації

Для аналізу клітинного типу, що досліджується, автором застосовані сучасні культуральні, молекулярно-генетичні, імунологічні, цито- та гістохімічні, а також статистичні методи. Так, для отримання клітин автор застосував метод культури клітин, а також постановку КУОф та визначення показників кінетики та динаміки росту клітинних популяцій *in vitro*; для виявлення експресії характерних маркерів та визначення фенотипу клітин – метод проточної цитофлуориметрії та імуноцитохімії; для детекції лужної фосфатази – цитохімічний метод *BCIP/NBT Liquid Substrate System*; для визначення життєздатності клітин у складі тканинно-інженерних конструкцій клітин – комбіноване забарвлення FDA/PI; візуалізація культур клітин, клітинних та гістопрепаратів досягалася методом прямої та інвертованої мікроскопії у світлі, що проходить, флуоресцентної, лазерної конфокальної та фазово-контрастної мікроскопії. Наукові положення, висновки та рекомендації, що сформульовані у дисертації, є достовірними та ґрунтовними. Статистична обробка ретельно проведена автором із застосуванням пакету прикладних

програм «MS Excel XP» та «Statistica SPSS 10.0 for Windows» та з використанням необхідних методів статистики.

4. Наукова новизна дослідження

Дисертантом вперше виявлена ієрархічна організація культур мСК-ПНГ з наявністю стовбурових, прогеніторних та диференційованих клітин; показано, що клональні культури зберігають здатність до спрямованого мультилінійного диференціювання у нейрони, Шваннівські клітини, адипоцити, остеобласти та хондроцити; виконано детальний аналіз впливу різних чинників на швидкість проліферації мСК-ПНГ та розроблена методика їхнього нарощування *ex vivo* зі збереженням морфофункціональних властивостей; розроблена методика створення тримірних конструкцій на основі мСК-ПНГ та фібринового гідрогелю для використання у регенеративній медицині; доведена ефективність використання отриманих конструкцій на експериментальних моделях ушкодження периферичного нерву та дефекту кісток черепа критичного розміру.

5. Практична цінність дослідження

Практична цінність роботи визначається розробкою протоколів культивування мСК-ПНГ та методів створення на їхній основі тримірних конструкцій. Результати досліджень можуть бути використаними у галузі біотехнології для розробки інноваційних клітинних та тканинно-інженерних продуктів для застосування у регенеративній медицині. За матеріалами дисертації отримано Патент України на корисну модель № 66086 «Спосіб культивування мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з бульбарного регіону волосяного фолікула дорослих ссавців».

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

Наукові положення та висновки дисертаційної роботи наводяться на підставі вичерпного аналізу результатів культуральних, молекулярно-біологічних, імунологічних, цитохімічних і гістохімічних досліджень, що базуються на адекватних методах та достатній статистичній та математичній

обробці отриманого цифрового матеріалу. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає цілям та задачам досліджень, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

7. Загальні відомості про роботу

Дисертація побудована за традиційним принципом та має такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи, три розділи власних досліджень, обговорення та узагальнення отриманих результатів, висновки, список використаних літературних джерел.

За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць: 8 статей у провідних фахових виданнях, один розділ у монографії, один патент України на корисну модель та 7 тез у збірках міжнародних конференцій.

У вступній частині роботи обґрунтовано актуальність обраного напрямку досліджень. Вступ містить усі необхідні підрозділи згідно вимог ДАК. Мета, задачі, новизна та практичне значення роботи сформульовані чітко та логічно.

В огляді літератури автором детально та змістовно розглядаються походження в ембріогенезі, розповсюдження у дорослому організмі, можливості культивування та використання культивованих мСК-ПНГ та тримірних конструкцій на їхній основі у регенеративній медицині. Огляд літератури містить великий масив інформації щодо біології мСК-ПНГ, шляхів їхнього диференціювання та міграції в організмі, а також участі у регенерації тканин.

В другому розділі наведені матеріали та методи дослідження. Описані методи є сучасними і адекватними для вирішення поставлених задач.

Розділ 3 присвячений дослідженню ізоляції та культивуванню мСК-ПНГ миші *in vitro* з вивченням їхніх властивостей у культурі.

У Розділі 4 йдеться про значний терапевтичний потенціал досліджуваного клітинного типу у модельних системах як *in vitro* так і *in vivo*.

Розділ 5 присвячений дослідженню ізоляції та культивування мСК-ПНГ людини *ex vivo* з вивченням їхніх властивостей за умов культивування.

В Розділі 6 проведено аналіз і узагальнення результатів дослідження, автор послідовно та грамотно обговорює отримані у роботі дані та ґрунтовно їх вписує у систему сучасних біологічних знань.

П'ять висновків дисертаційної роботи цілком відображають суть роботи. Вони дають вичерпну відповідь на поставлені завдання.

Дисертація побудована логічно, достатньо ілюстрована, написана зрозумілою мовою з додержанням наукового стилю викладення матеріалу.

Проте у процесі роботи з текстом дисертації у опонента виникли наступні запитання:

1. Чи вкладає автор у поняття мультипотентності дослідження гемопоетичних нащадків стовбурових клітин?
2. Що означає дефект критичного розміру і який це розмір?
3. Як розраховували кількість нервових волокон і з чим автор пов'язує той факт, що у контрольній групі без мСК регенерація відбувалася досить активно (8000 проти 10000 відповідно)?
4. Як можна пояснити кращі умови культивування у разі використання гідрогелів і у чому перевага фібринового гелю у порівнянні з колагеновим?
5. Які перспективи використання розробленого методу культивування у регенеративній медицині пропонує автор?

8. Характеристика змісту роботи

Вступ до роботи написано лаконічно із залученням основних посилань на узагальнюючі літературні джерела. Він є достатнім як з позиції актуальності обраної теми, так і сформульованої мети та завдань дослідження. У вступі охарактеризовано наукову новизну дослідження та її науково-практичну цінність. Наведено дані щодо публікацій та апробації основних, базових результатів дослідження.

Перший розділ роботи «*Огляд літератури*» містить основні положення, що стосуються аналізу особливостей сучасних уявлень про розвиток регенеративної медицини, роль різних типів стовбурових клітин у технологіях

регенеративної медицини, та загальний стан і перспективи використання постнатальних мСК-ПНГ у цій галузі.

Другий розділ «*Матеріали та методи дослідження*» детально розкриває базові етапи роботи: застосовані методи отримання та культивування клітин *in vitro* (моношарове культивування, дослідження впливу різних чинників на проліферацію клітин, створення 3D-конструкцій, направлене мультилінійне диференціювання), використані експериментальні моделі патологічних станів *in vivo* та *ex vivo*, та застосовані імунологічні, гістоморфометричні та молекулярно-біологічні методи аналізу клітин та тканин. Описані методи є сучасними і адекватними щодо вирішення поставлених задач.

Автором досліджені та встановлені (*Розділ 3*) специфічні морфофункціональні властивості постнатальних мСК-ПНГ в культурі *in vitro*: існування КУО різних типів та субпопуляції ALDH^{bright} клітин, ідентифіковані нові характерні маркери, а саме транскрипційний фактор Sox2 та поверхневий рецептор CD349 (Frizzled-9), вивчено вплив різних чинників на швидкість росту постнатальних мСК-ПНГ та продемонстровано стимулюючий вплив низької щільності посіву (10-1000 клітин на см²) та низького вмісту кисню (5 % та 10 %) на їх проліферацію. Автором розроблено живильне середовище з низьким вмістом ембріональної телячої сироватки (ETC), що здатне підтримувати експансію постнатальних мСК-ПНГ зі збереженням їх морфофункціональних властивостей та має переваги у швидкості росту у порівнянні з відомим живильним середовищем на основі ETC та екстракту курячих ембріонів. Також досліджена здатність постнатальних мСК-ПНГ до направленого мультилінійного диференціювання, яка підтверджена на рівні клітин-попередників у культурі з напіврідким агаром.

В *Розділі 4* наводяться дані про використання культивованих постнатальних мСК-ПНГ миші в експериментальних модельних системах. Показано, що трансплантація постнатальних мСК-ПНГ у ділянку пошкодження сідничного нерву сприяє відновленню нервових волокон (відповідно кількість

волокон $10522,8 \pm 1044,0$ у групі з трансплантацією мСК-ПНГ і $8409,5 \pm 739,5$ у контрольній групі, різниця статистично достовірна, $p < 0,05$). На моделі дефекту кісток склепіння критичного розміру встановлено, що трансплантація тканинно-інженерних 3D-конструкцій на основі мСК-ПНГ призводить до відновлення кісткової тканини, тоді як у контрольній групі регенерації не відбувається. З використанням короточасної киснево-глюкозної депривації (КГД) органотипової культури гіпокампу доведено значний нейропротекторний вплив трансплантації мСК-ПНГ. Так на 14-у добу після КГД кількість NeuN⁺ нейронів у зоні CA1 гіпокампу становила $197,1 \pm 22,2$ клітин, тоді як у групі з трансплантацією мСК-ПНГ – $468,1 \pm 19,2$ нейронів (різниця статистично достовірна, $p < 0,001$), що співпадає з кількістю нейронів у зоні CA1 неушкодженого гіпокампу ($454,0 \pm 39,3$ клітин).

Розділ 5 присвячений дослідженню ізоляції та культивування мСК-ПНГ людини *in vitro* з вивченням їхніх морфофункціональних властивостей за умов їх експансії до терапевтичної кількості. Автором підібрано оптимальні умови для ізоляції, культивування та великомасштабного нарощування клітин цього типу до терапевтично-значущих доз (більше 100 млн клітин) із збереженням їх морфофункціональних властивостей. Дисертант доводить, що необхідна для клінічного застосування кількість клітин може бути отримана протягом місяця культивування. Це дозволяє розглядати можливість розробки протоколів з використанням способу експансії культивованих клітин на основі постнатальних мСК-ПНГ для лікування ушкоджень спинного мозку та дефектів периферичних нервів.

Аналіз та узагальнення результатів (**Розділ 6**) викладено у відповідності до послідовності завдань роботи та окремих розділів власних досліджень. Ознайомлення з цим розділом дало відчуття цілісності виконаної роботи. Автор володіє знанням сучасної наукової літератури, вміло описує й аналізує отримані результати.

Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями роботи та відповідають поставленим завданням.

Список використаних джерел складено згідно існуючих вимог, із чітким дотриманням діючих правил щодо бібліографічних посилань.

9. Повнота викладання матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Фактичні дані, а також теоретичні узагальнення повною мірою висвітлені у 19 публікаціях, з яких – 7 статей у фахових виданнях, 2 – без співавторів, 10 тезах матеріалів науково-практичних конференцій, конгресів, з'їздів, отримано 1 деклараційний патент України на корисну модель.

Автореферат за змістом відповідає суті дисертаційної роботи, і в ньому відображено головні її положення.

10. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення

Автореферат написаний у відповідності до змісту дисертаційної роботи і повністю віддзеркалює її суть. Основні положення дисертації та її висновки ідентичні за змістом автореферату. Оформлення дисертації та автореферату відповідає сучасним вимогам. Принципових зауважень до оформлення та змісту дисертаційної роботи й автореферату немає. Водночас, слід зауважити, що в тексті дисертації зустрічаються поодинокі описки. Водночас, наведені у дискусії з автором рекомендації були виконані та сприяли покращенню оформлення дисертаційної роботи. Вони не впливають суттєво на загальне позитивне враження від її змісту та оформлення.

11. Рекомендації щодо використання результатів дослідження у практиці

Отримані результати у вигляді протоколів культивування мСК-ПНГ та методів створення на їхній основі тримірних конструкцій можуть бути використаними у галузі біотехнології для розробки інноваційних клітинних та тканинно-інженерних продуктів, які у подальшому займуть достойне місце у регенеративній медицині.

12. Відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертація Васильєва Романа Геннадійовича “Морфофункціональні властивості мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з

волосяного фолікула та біотехнологічні аспекти їх використання у регенеративній медицині”, представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за фахом 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки) за актуальністю, науковою новизною, теоретичною та практичною значимістю, достовірністю отриманих результатів є завершеною науково-дослідною роботою та відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01. Робота містить нове, ефективне рішення актуальної задачі та присвячена актуальним питанням ізоляції, культивування, визначення морфофункціональних властивостей мСК-ПНГ і розробці тривимірних конструкцій на їхній основі для подальшого використання в регенеративній медицині.

Висновок

Дисертація Васильєва Романа Геннадійовича “Морфофункціональні властивості мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня з волосяного фолікула та біотехнологічні аспекти їх використання у регенеративній медицині”, представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за фахом 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки) за актуальністю, науковою новизною, теоретичною та практичною значимістю, достовірністю отриманих результатів, обґрунтованістю висновків відповідає вимогам п.п. 31-36 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого Постановою КМУ від 24.07.2013 №567, а її автор – Васильєв Р. Г. заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки).

доктор медичних наук, професор
Керівник Центру молекулярних та клітинних досліджень
Національного університету
«Кієво-Могилянська академія»

Н. М. Білько

Н. М. Білько

