

ВІДГУК

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

Похідні нервового гребня становлять значний інтерес для регенеративної медицини. Відомо, що постнатальні мультипотентні стовбурові клітини - похідні нервового гребня (МСК-ПНГ) мають здатність до спрямованого диференціювання в мезенхімальні та нейральні клітинні типи дорослого організму. Завдяки даним властивостям МСК-ПНГ можуть бути використані для відновлення дефектів кісток, ушкоджень спинного мозку, дефектів периферичних нервів, а також строми рогівки, тощо. Однак слід відзначити знижену ефективність клітинної трансплантації, пов'язану зі слабким накопиченням уведених клітин в тканині-мішені після їхньої ін'єкції в результаті загибелі субстрат-залежних клітин за механізмом апоптозу. Ефективність трансплантації може бути підвищена шляхом створення тривимірних (3D) тканинноінженерних конструкцій, таких як клітинні сфероїди або біоеквіваленти тканин на основі клітин і компонентів позаклітинного матриксу. Перспективним напрямком є розробка тканинноінженерних 3D-конструкцій на основі біосумісних гідрогелей, що дає можливість однорідного за розподілу клітин у складі трансплантату, забезпечує високу життєздатність клітин, та можливість отримувати трансплантати заданої форми, а також використовувати різні природні і синтетичні полімери та їхні комбінації для регулювання їх фізичних параметрів (еластичність, твердість, пористість, та ін.).

Це обумовлює актуальність та доцільність дисертаційної роботи щодо вивчення морфофункціональних властивостей постнатальних МСК-ПНГ із волосяного фолікула дорослих ссавців, та розробки біотехнологічних аспектів їх використання у регенеративній медицині.

Отже, вважаю дисертаційну роботу Васильєва Р.Г. актуальною, достатньо новітньою, та прогресивною з точки зору регенеративної та трансляційної медицини, як в теоретичному, та практичному значенні.

В своїй роботі автор використовує сучасні культуральні, молекулярно-біологічні, імунологічні, цитохімічні, гістохімічні та статистичні методи дослідження. А саме: клітинне культивування *in vitro* (моношарова культура, 3D культура клітин в гідрогелях, органотипова культура зрізів гіпокампу, сферогенез, направлене диференціювання); проточна цитометрія; цитохімічний і імуноцитохімічний аналізи; молекулярно-біологічні методи (виділення РНК, ПЛР зі зворотною транскрипцією, електрофорез нуклеїнових кислот); гістологічний і морфометричний аналізи; мікроскопія (світлопольна в світлі, що проходить, фазово-контрастна, флюоресцентна, конфокальна лазерна скануюча); мікрохірургічні методи; статистичний аналіз. Весь комплекс застосованих методичних прийомів повністю відповідає цілям та задачам дослідження, кількість яких достатня для отримання достовірних результатів.

Наукова новизна та практична цінність дослідження не викликає сумнівів. Дисертантом вперше показано існування в популяції культивованих постнатальних МСК-ПНГ миші клітин, що мають різний проліферативний потенціал за умов клональної щільності, тобто утворюють різні типи колоній. Із колоній, що були позначені як КУО III-го типу, були отримані клональні культури. Як показано в дослідженні, ці клональні культури зберігають здатність до направленого мультилінійного диференціювання у нейрони, Шваннівські клітини, адипоцити та остеобласти. Також була показана здатність цих КУО III-го типу до самовідновлення і формування вторинних та третинних колоній. Автором вперше розроблена та оптимізована методика нарощування терапевтичної кількості постнатальних МСК-ПНГ людини *in vitro* із збереженням морфофункціональних властивостей. На експериментальних моделях ушкодження периферичного нерву та дефекту кісток склепіння критичного розміру розроблена автором методика створення 3D-конструкцій на основі МСК-ПНГ та фібринового гідрогелю показала високу терапевтичну ефективність.

Практична цінність роботи визначається розробкою протоколів культивування постнатальних МСК-ПНГ та методів створення на їхній основі тримірних конструкцій. Результати досліджень можуть бути використані у галузі біотехнології для розробки інноваційних клітинних та тканинно-інженерних продуктів для застосування в регенеративній медицині.

Практичне значення результатів даного дослідження підтверджується Патентом України на корисну модель №66086 «Спосіб культивування мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня з бульбарного регіону волосяного фолікула дорослих ссавців».

Результати дослідження впроваджено у роботу лабораторії цитогенетики ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» та у роботу біотехнологічної лабораторії *ilaya.regeneretion* медичної компанії *ilaya*[®] (Київ, Україна) для лікування гриж міжхребцевих дисків, демієлінізуючих захворювань нервової системи, контузійних уражень спинного мозку, відновлення дефектів периферичних нервів та кісток скелетина.

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

Дисертація викладена українською мовою на 152-х сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, розділу, присвяченому аналізу та узагальненню отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел.

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. Однак

вважаю, що у завданнях 2-4 напевно потрібно було вказати, що це клітини миші, так як в роботі також досліджували клітини людини.

Перший розділ роботи «*Огляд літератури*» вміщує основні положення, що стосуються аналізу особливостей сучасних уявлень про розвиток регенеративної медицину, 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 до вирішення поставлених задач.

Викладення власних результатів зроблено згідно загальної мети та поставлених завдань. 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 (ЕТС), що здатне підтримувати експансію постнатальних МСК-ПНГ із збереженням їх морфофункціональних властивостей та має переваги у швидкості росту у порівнянні з відомим живильним середовищем на основі ЕТС та екстракту курячих ембріонів. Також досліджена здатність постнатальних МСК-ПНГ до направленого

мультилінійного диференціювання, яка підтверджена на рівні клональних культур.

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. 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 дефект лишається не загоєним. З використанням короткочасної киснево-глюкозної депривації (КГД) органотипової культури гіпокампу доведено значний нейропротекторний вплив трансплантації МСК-ПНГ.

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 аутологічних медичних продуктів 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 та аналізує отримані результати.

Висновки узагальнюють результати досліджень, є обґрунтованими та відображають основні напрями роботи. Вони викладені послідовно, що свідчить про відповідні досягнення при розв'язанні поставлених завдань та мети роботи. Як відзначив, що висновки написані надзвичайно скромно і не

повною мірою відображають різноманітність і сучасність використаних підходів.

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

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. На жаль, в списку робіт не зазначені статті, опубліковані в журналах, що входять до міжнародних баз даних.

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

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення

Суттєвих недоліків у дисертаційній роботі та авторефераті не виявлено. Дисертація й автореферат написані логічно, з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і оформлення, хоч і не позбавлені деяких помилок не принципового або технічного характеру. Наприклад, в авторефераті в підписі до рис.10 вказано живильне середовище №2, а в рис. та тексті - №3.

Під час офіційного захисту, на мою думку, варто обговорити наступні питання:

1. Ви називаєте отримані вами культури клітин від людини та миші культурами «мультипотентних стовбурових клітин», але як показано у роботі лише частка клітин позитивна за маркерами стовбурових клітин, та здатна до колонієутворення. Отже наскільки ці клітини насправді є стовбуровими?
2. При вивченні клоногенних потенціалу автор виділяє 3 типи клітинних колоній: 1 група - 5%, 2 група - 13%, 3 група - 31%. Разом вони складають близько 50%. Питання: 50% колоній, що залишилися належали до змішаного типу?
3. Автор зазначає, що при пасируванні знижується відсоток деяких типів колоній. При цьому робиться припущення, що до 3 пасажу значна

- кількість клітин спонтанно диференціювалися. Чи є цьому якась пояснення? І в якому напрямку сталося диференціювання?
4. У роботі показано існування субпопуляції клітин з високою активністю ферменту альдегіддегідрогенази (ALDH^{bright} клітини), але зв'язок з функціональністю цих клітин не встановлено. Чи дійсно цей показник має зв'язок із стовбуровими клітинами?
 5. Автор підібрав і експериментально обґрунтував оптимальний склад середовища, щільність посіву та вміст кисню для культивування клітин. Наскільки комплекс підібраних умов, дозволяє збільшити кінцевий вихід клітин та їх "стовбуровість" в порівнянні зі стандартним способом експансії?
 6. Чи проводили порівняння клітин отриманих з мишей і від людини? У клітин людини дуже сильно варіює показник маркера CD271. Чи має автор пояснення цього явища?

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Васильєва Романа Геннадійовича "Морфофункціональні властивості мультипотентних стовбурових клітин – похідних нервового гребня з волосяного фолікула та біотехнологічні аспекти їх використання у регенеративній медицині" за актуальністю, методичним рівнем, новизною отриманих результатів повністю відповідає вимогам п.11 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого Постановою КМУ від 24.07.2013 №567 (зі змінами), а її автор – Васильєв Р.Г. заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія (біологічні науки).

Завідуючий відділом кріобіохімії
Інституту проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України,
доктор біологічних наук, професор



Петренко О. Ю.

