

## ВІДГУК

офіційного опонента професора кафедри екології та зоології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса

Шевченка д.б.н., проф. Л.В.Гарманчук на дисертаційну роботу

### **Папуги Олександра Євгенійовича «РОЗРОБКА ДЕРМАЛЬНИХ ЕКВІВАЛЕНТІВ ШКІРИ З ВИКОРИСТАННЯМ КЛІТИН ЛЮДИНИ І НОВИХ БІОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ МАСИВНИХ ОПІКІВ»,**

подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за

спеціальністю **03.02.20 – біотехнологія**

1. **Актуальність теми дисертації.** Дисертаційна робота О.Є.Папуги присвячена вирішенню актуальної фундаментально-прикладної проблеми, розробці дермальних еквівалентів шкіри з використанням клітин людини та біологічно-активних речовин, що кондиціюються культивованими клітинами в поєднанні з новими біологічно безпечними матеріалами для лікування масивних опіків, які залишаються однією з актуальних проблем сучасної медицини. Серед терапевтичних методів лікування опікової хвороби використовуються різні покриття, що містять біологічно-активні носії. Проте не винайдено ефективних замінників шкіри, тому зусилля біотехнологів всього світу спрямовані на пошук нових шляхів до вирішення цього важливого завдання. На сьогодні перспективним напрямом вважається використання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) або мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) людини. Нарощування та використання клітин потребують затратних реактивів та довготривалого культивування і технологій зберігання. Як альтернатива в представленій роботі пропонується кондиційоване середовище від МСК, що спрощує використання біологічно-активних речовин, які секретуються цими клітинами. Насичення кондиційованим середовищем штучного покриття і нанесення в такій комбінації на опікову раневу поверхню призводить до пришвидшення загоєння ран, особливо з обширною площею.

Таким чином в дисертаційній роботі Папуги О.Є представлені результати експериментальних досліджень на моделях з індукованими опіковими ранами щодо використання біотехнологічних комбінацій штучних біоплівки з нанесеними клітинами чи їх кондиційованим середовищем в якості терапевтичних засобів при масивних опіках.

Роботу виконано в рамках науково-дослідних проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: НДР «Розробка методу одержання біотехнологічних ранових покриттів для подальшого використання в медицині» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації 0115U001358, 2015-2019 рр.); НДР «Отримання нових дермальних ранових покриттів для лікування масивних опіків і травматичних уражень шкіри іншого генезу» цільової програми наукових досліджень НАН України «Матеріали для медицини і медичної техніки та технології їх отримання і використання» (номер державної реєстрації 0117U001929, 2017-2021 рр.).

**2. Наукова новизна роботи** полягає у створенні нових біотехнологічних продуктів, а саме з використанням клітинної технології отримано еквіваленти дермального шару шкіри з включенням клітин людини оригінальних ліній або їхніх похідних (кондиційованих середовищ, що містять комплекс біологічно активних речовин, синтезованих клітинами в культурі) та охарактеризовано терапевтичну доцільність даних комбінацій в експерименті.

**3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.** Результати дисертаційної роботи щодо отримання біотехнологічних продуктів та їх терапевтична дія підтверджено патентом України за №112584 від 26.09.2016 «Спосіб одержання тимчасового еквіваленту дермального шару шкіри» та патентом на корисну модель за №127876 від 27.08.2018

«Спосіб одержання тимчасового пластичного раневого покриття «гель-клітина» для лікування опікових ран», в яких зазначено, що як самі клітини лінії 4BL, так і зразки кондиційованого ними середовища БКС-4BL прискорюють загоєння термічних ран шкіри у модельному експерименті на тваринах (опіки III ступеню) і гальмують запальні процеси у місці загоєння.

#### **4. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Дисертантом проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних біотехнологічних, біохімічних, клітинно-біологічних та методів експериментальної терапії масивних опікових поверхонь. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам для підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних, зроблені висновки відображають поставлені завдання дисертаційної роботи.

#### **5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.**

Дисертацію побудовано за традиційним планом. Вона складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, 2 розділів власних досліджень, розділу узагальнення та аналізу отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел. Текст із переліком літератури (231 джерело, із них майже половина датована в останні 10 років), ілюстраціями (21 рисунок та 12 таблиць) викладено українською мовою на 167 сторінках машинописного тексту, із яких 118 сторінок припадає на основну частину.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність теми: зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; мета і задачі дослідження; дано визначення об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий

внесок здобувача, апробацію результатів дисертації; публікації, а також про структуру та обсяг дисертації.

**Розділ 1** присвячений огляду літератури, у якому детально описані різні штучні матриці природнього та синтетичного характеру, які на сьогодні використовуються як покриття при лікуванні опікових масивних поверхонь. Також наведено сучасні дані щодо використання клітин та їх продуктів, які сорбуються на штучні поверхні і використовуються як стимулятори відновлення шкіри після опікових ран. Огляд літератури складається з 5 підрозділів, у 4 із яких наведено дані світової наукової літератури щодо використання штучних замінників шкіри окремо та в комбінації з клітинами, а в 5 підрозділі наведено попередні розробки відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, в якому проводились дослідження даної дисертаційної роботи. Огляд літератури підсумовується узагальненнями щодо властивостей клітин оригінальної лінії, отриманої у відділі, а також наголошено на актуальності створення біокомполімерів не лише з використанням сорбованих на поверхню штучних покриттів клітин, а й з використанням безклітинних кондиційованих середовищ, як джерела біологічно-активних речовин, які б сприяли процесам ранезаживлення при масивних опікових травмах. *Разом з тим, незважаючи на високий рівень та критичний аналіз наведеного літературного огляду до розділу є декілька зауважень, які стосуються правил викладення наукової роботи: по-перше, не прийнято використовувати при описі займенники першої особи («я», «ми»), зазвичай їх доцільно замінити неозначеною формою – нами було зроблено, досліджено, показано і. т.д.; по-друге, зустрічаються громіздкі речення та вирази, які доцільно було б замінити на більш лаконічні; по-третє, зустрічаються повтори, і загалом, розділ огляд літератури потребує більш структурованого та лаконічного викладення матеріалу.*

**Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень»** згруповано за 3 підрозділами, де наведено експериментальні моделі, методичні підходи та

схеми досліджень. Також зазначено біоетичні норми та принципи проведення токсикологічних досліджень на експериментальних моделях тварин, в тому числі з індукованими патологіями.

**У підрозділі 2.1** «Створення і використання штучних носіїв клітин і біологічно активних речовин» детально описано методи підготовки різних штучних покриттів для використання на біологічних об'єктах. *Однак не зазначено автором, яким чином дані покриття стерилізували, адже на першому етапі випробувань на ці покриття наносили клітини, які потім витримували протягом певного часу культивування. Чи не могло бути недотримання стерильних умов причиною кантамінації біокомполімерів біоплівки із сорбованими клітинами?*

**Підрозділ 2.2.** присвячено опису клітин і біологічно активних компонентів біоконструкцій, створених у представленій роботі. Зокрема, детально описана клітинна лінія 4BL – лінія дорослих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) людини, яка була отримана у відділі генетики людини ІМБГ НАН України доктором біологічних наук Л.Л.Лукаш з периферійної крові здорового донора. В підрозділі зазначається, що клітини цієї лінії охарактеризовані детально з використанням низки методів клітинної і молекулярної біології (проточної цитометрії, імунофлюоресцентного аналізу, звичайної ПЛР та кількісної РТ-ПЛР, аналізу на здатність до мультипотентного диференціювання *in vitro*, а також шляхом визначення проліферативного індексу та колонієутворювальної здатності). Фенотип клітин лінії 4BL такий: CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>-</sup>. Однак, *щодо даної клітинної лінії варто було б навести більш уточнені дані (паспорт чи сертифікат), де б зазначались основні параметри (термін подвоєння, умови кріоконсервації, кількість пасажів і т.д.), адже це основний біологічний об'єкт дослідження в складі біокомполімерів.*

*Ті ж самі зауваження та запитання стосуються клітинної лінії E8.*

*Щодо напрацювання безклітинного кондиційованого середовища: чи проводилась Вами характеристика на наявність біологічно-активних компонентів в БКС і яких саме? Тобто за якими властивостями Ви визначали характеристики БКС при культивуванні клітин за різного ступеню конфлюентності?*

**Підрозділ 2.3** присвячено характеристиці методів щодо визначення якості та ефективності біоконструкцій, створених на основі клітин/БКС та різних біоплівок. *Цей підрозділ варто було б розділити на декілька: визначенню якості та ефективності біоконструкцій in vitro щодо впливу на культивовані клітини та доведення терапевтичної ефективності в експериментах in vivo. Також статистичний аналіз варто вивести окремим підрозділом.*

**Розділ 3** присвячено розробці нових біотехнологічних носіїв для виготовлення тимчасових еквівалентів дерми з включенням стовбурових клітин або їх похідних. Детально охарактеризовані різні штучні покриття, модифіковані під створення біокомпозитів з клітинами або ж з БКС. Частина цих штучних покриттів було модифікована додаванням наночастинок срібла оксиду заліза. Останні, на думку автора, мають магнітні властивості, і не виключено, що завдяки цьому вони могли здійснювати певний вплив на метаболічну активність клітин. *Однак, використовуючи наночастишки в якості додаткових модифікаторів біоплівки, автором не зазначено, з якою метою було проведено дане дослідження в рамках дисертаційної роботи. То все-таки, для чого проводились ці експерименти, яким присвячено частину підрозділу 3.1 варто було б зазначити.*

**Підрозділ 3.2.** Використання біоплівки симбіотичного організму *Medusomyces gisevii* як мембрани-носія для створення тимчасових дермальних еквівалентів характеризує біоплівки симбіотичного організму з клітинами і як висновок вказано на його неефективність в складі біокомпозитів.

Надалі автором в **підрозділі 3.3.** наведено результати дослідження біокомпозитів на основі біоплівки білкозин, яка використовується в харчовій промисловості, і відповідно, не проявляє токсичних ефектів. Власне на цьому штучному покритті було зосереджено основні дослідження даної дисертаційної роботи. Згідно результатів даного підрозділу було виявлено, що колагенова плівка "Білкозин" є найпридатнішою матрицею в якості носія біологічно активних клітинних компонентів при створенні біотехнологічних тимчасових дермальних еквівалентів. Ці дані підтверджено експериментами на моделях опікових ран у тварин, на яких виявлено стимуляцію регенерації дермального шару шкіри і відновлення епітелію і, відповідно, отримано патент України на винахід.

*В цьому зв'язку виникає запитання, чи досліджували Ви терапевтичну ефективність штучних поліакриламідних гідрогелевих матриць та целюлозних біоплівок симбіотичного організму *Medusomyces gisevi*, чи лише обмежились експериментами *in vitro*, з яких і зробили висновок щодо неефективності запропонованих покриттів?*

**Розділ 4** присвячено створенню пластичних мазеподібних гелей, що містять клітини людини або безклітинні культуральні середовища, кондиційовані цими клітинами на основі карбополового гідрогелю (Carbopol 980), який використовується в медичній практиці. До цього носія додавали три компоненти: клітини різного походження, клітинні лізати та безклітинні культуральні середовища (БКС), кондиційовані клітинами *in vitro*. Було вперше розроблено методику отримання мазеподібного гідрогеля карбополу, який міг би слугувати субстратом для іммобілізації клітин, і показано, що карбополовий гідрогель, приготований із застосуванням стандартного культурального середовища DMEM-HG, може слугувати об'ємним носієм для сорбції клітин і підтримувати їх життєдіяльність на високому рівні протягом кількох годин. За цими результатами отримано патент на корисну модель. Вперше проведено порівняльне дослідження (з використанням моделі опікових ран у мишей)

ранозагоювальних властивостей клітин людини ліній (4BL, E8, A102) і безклітинних середовищ (БКС), кондиційованих клітинами цих ліній, у складі біоконструкцій на основі карбополового гідрогелю. Показано, що ранозагоювальна властивість притаманна клітинам різного походження, але більш ефективною є оригінальна клітинна лінія 4BL та БКС від цих клітин, які стимулюють найефективніше процеси загоєння ран у експериментальних тварин, особливо, на ранніх стадіях. Клітинні лізати, які отримували як компонент біологічно-активних речовин подібної ефективності не проявили.

Показано, що терапія опікових ран з використанням біоконструкцій, що містять середовище, кондиційоване клітинами лінії 4BL (БКС-4BL), супроводжується стимуляцією капіляроутворення у ложі рани, а в тканинах опікової зони спостерігається статистично достовірне зниження вмісту регуляторних білків MMP2 та HIF-1 $\alpha$  майже до рівня, характерного для шкіри інтактних тварин.

Також відпрацьовано найбільш придатні підходи щодо культивування клітин для отримання БКС та оптимальні умови для його зберігання.

До даного розділу є ряд запитань та зауважень, зокрема:

*В експериментах на моделях опікових ран у тварин Ви використовували ксеногенний матеріал (клітини та БКС людського походження) чи не виявляли Ви відторгнення біокомполімерів або ж якихось інших проявів зі сторони імунної системи експериментальних тварин?*

*А можливо, суть терапевтичного ефекту у тварин і полягає в тому, що використовувався ксеногенний матеріал?*

*І, в перспективі, при використанні даних біокомполімерів в клінічній практиці, Ви очікуєте більшої терапевтичної ефективності? До того ж, що в цьому аспекті, зазначається в правилах біоетики, адже використання клітинних ліній (а вони підтримуються в культурі довготривало і імовірно є іморталізованими) потребує визначення їх онкогенності, генотоксичності і т.і.?*



*І, як на Вашу думку щодо можливості використання первинних культур МСК, отриманих від добровільних донорів з різних джерел (наприклад, жирової тканини, плацентарного походження)?*

*Чому Ви власне досліджували в раневій поверхні експресію MMP2 та HIF-1 $\alpha$  і чи є ці показники ключовими для підтвердження ранозагоювальної ефективності опікових поверхонь?*

**У розділі 5 «Аналіз та узагальнення результатів»** детально аналізуються отримані результати щодо різних способів та методів створення біокомпозитів на різних штучних матрицях та з додаванням різного біологічно-активного матеріалу. В даному розділі автор піддає детальному та критичному аналізу результати власних досліджень, аналізує їх із практичних точок зору та в порівнянні з даними літератури, висловлює власні припущення щодо терапевтичної ефективності створених біокомпозитів. Автором наголошується щодо необхідності створення нових біотехнологічних ранових покриттів (а саме штучних еквівалентів дерми) з включенням клітин людини різних установлених ліній або їхніх похідних, що призначені для лікування опікової хвороби як соціально значимого замовлення в умовах нинішньої ситуації в медичній, зокрема, в комбустіологічній галузі України.

Також обговорюються перспективи використання наночасток в складі біокомпозитів для терапії опікових поверхонь. Дані дослідження частково проведені, хоча не апробовані в експерименті і, тому, відкривають нові перспективи для дослідження автором та колегами в рамках даної актуальної фундаментальної та практичної проблеми.

Наведені **висновки** відповідають меті та завданням, поставленим автором, проте деякі із них містять припущення як от у 6 висновку *«що може свідчити про гальмування запального процесу і більш раннє завершення першої фази загоєння рани»* або ж у 7 висновку *«імовірно, не має суттєвого значення для прояву ранозагоювальних властивостей цього біологічного фактору»*. Такі припущення варто наводити у аналізі та обговоренні даних,

*а висновки повинні бути більш лаконічними.*

**Перелік використаних джерел літератури** містить 231 посилання українською та іноземними мовами, переважна більшість яких опублікована в останні 10 років.

Таким чином, дисертація Папуги Олександра Євгеновича «Розробка дермальних еквівалентів шкіри з використанням клітин людини і нових біоматеріалів для лікування масивних опіків» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

#### **6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.**

Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних форумах та з'їздах. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано в 12 наукових працях, серед яких 7 наукових статей у фахових виданнях, 3 тез доповідей, 2 патентах України (1 патент на винахід і 1 патент на корисну модель).

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної проблеми, на які спирається автор. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору.

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

#### **7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і формлення.**

За позитивної оцінки роботи, проведеної автором можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації, таких як присутність в тексті дисертації мовних неточностей, русизмів, описок та невдалих перекладів з англійської мови.

Більшість із недоліків та запитань було прокоментовано при аналізі розділів дисертаційної роботи, тому не вважаю за доцільне зупинятись на цих питаннях та зауваженнях повторно.

Однак наведені недоліки та зауваження не знижують загального позитивного враження про роботу і дисертація Папуги Олександра Євгенійовича «Розробка дермальних еквівалентів шкіри з використанням клітин людини і нових біоматеріалів для лікування масивних опіків» в цілому є завершеним актуальним самостійним дослідженням, виконаним на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та відповідністю висновків поставленим завданням. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки. Автореферат дисертації достатньо повно та адекватно висвітлює її зміст.

#### **8. Відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Дисертаційна робота Папуги Олександра Євгенійовича «Розробка дермальних еквівалентів шкіри з використанням клітин людини і нових біоматеріалів для лікування масивних опіків» є самостійною, завершеною науковою працею, містить нове вирішення важливого науково-практичного завдання біотехнології – створення сучасних новітніх біокомпозитів зі штучних покриттів та біологічно-активних компонентів для лікування масивних опікових поверхонь

Результати роботи мають науково-теоретичне і практичне значення. Наукові положення, висунуті автором, та отримані результати мають суттєве значення для терапії опікових ушкоджень.

Таким чином, дисертаційна робота Папуги Олександра Євгенійовича за актуальністю проблеми, методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною отриманих результатів, обґрунтованістю висновків, теоретичною та практичною значимістю, представлена на

здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія є закінченим науковим дослідженням та відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р., № 567 від 27.07.2016 р., № 943 від 20.11.2019 р., № 607 від 15.07.2020 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а здобувач Папуга Олександр Євгенійович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Професор кафедри екології та зоології  
ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка д.б.н., проф.

 Л.В.Гарманчук

Підпис проф. Л.В.Гарманчук

Засвідчую

17.09



