

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, д. б. н., професор, академік НАН України

Михайло Тукало

“16” вересня 2024 р.



ВІСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації на тему «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2»

на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

ВИТЯГ

із протоколу засідання об'єднаного семінару відділу функціональної геноміки, відділу сигнальних систем клітини, відділу генетики людини, відділу молекулярної онкогенетики, відділу ензимології білкового синтезу, та відділу генетики клітинних популяцій ІМБГ НАН України від “16” вересня 2024 р.

З метою надання висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації 16 вересня 2024 року на об'єднаному семінарі наукових відділів ІМБГ НАН України – здобувач ступеня доктора філософії Букресва Тетяна Василівна публічно презентувала наукові результати дисертації на тему «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2».

Присутні. Головуючий на засіданні – д.б.н., проф., зав. групи Оболенська М.Ю., д.б.н., ст.н.с. Півень О.О., д.б.н., ст.дослідник, пров.н.с. Геращенко Г.В., к.б.н., ст.н.с. Шаблій В.А., член-кор. НАН України, д.б.н., ст.н.с. Сергеева Т. А., к.б.н., ст.н.с. Скрипкіна І.Я., академік НАН України, д.б.н., зав. відділу Філоненко В.В., к.б.н., ст.н.с. Арешков П.О., к.б.н., н.с. Маньковська О.С., к.б.н., ст.н.с. Анопрієнко О.В., к.х.н., н.с. Бобровська М.Т., к.б.н., ст.н.с. Гордіюк В.В., к.б.н., с.н.с. Кропивко С.В., ст.д., ст.н.с. Шкотова Л.В., д.б.н., проф., заст. директора, зав.відділу Лукаш Л.Л., к.б.н., ст.н.с. Крупська І.В., н.с. Ковальчук М., н.с. Топорова М.О., студ. Грамаш Д.В., студ. Соломяна К.І., асп. Шлома А.Р., к.б.н., н.с. Грязнова Т.А., студ. Ломов А.

На засіданні були присутні 24 особи, у тому числі 6 докторів біологічних наук, 9 кандидатів біологічних наук, 2 кандидати хімічних наук.

Порядок денний. Обговорення дисертаційного дослідження аспірантки відділу функціональної геноміки Букресвої Тетяни Василівни на тему «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2», поданого на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Дисертація виконувалася у лабораторії біосинтезу нуклеїнових кислот відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол № 14 від 11 грудня 2020 року).

Науковий керівник – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, зав. лабораторії "Центр колективного користування науковими приладами НАН України" Інституту молекулярної біології і генетики НАН України Шаблій Володимир Анатолійович.

З дисертаційною роботою попередньо ознайомилися доктор біологічних наук,

професор, провідний науковий співробітник відділу генетики людини ІМБГ НАН України Півень Оксана Олександрівна та доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України Геращенко Анна Володимирівна.

Виступили.

Здобувач Букресєва Тетяна Василівна представила презентацію за основними положеннями дисертації на тему «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

З відгуком на роботу виступили науковий керівник – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, зав. лабораторії "Центр колективного користування науковими приладами НАН України" Шаблій В. А. та рецензенти - доктор біологічних наук, професор, провідний науковий співробітник відділу генетики людини ІМБГ НАН України Півень Оксана Олександрівна та доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України Геращенко Анна Володимирівна, які дали позитивну оцінку виконаній роботі, підкреслили її наукову новизну та актуальність визначення профілю імунних клітин і цитокінів в периферичній крові хворих для розуміння механізмів розвитку ГРДС, виокремили високий теоретичний та експериментальний рівень проведеного дослідження.

В обговоренні також взяли участь: ст.н.с. Сергєєва Т. А., к.б.н., ст.н.с. Скрипкіна І.Я., д.б.н., зав. відділу Філоненко В.В.

На засіданні обговорили проєкт висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2».

Актуальність теми.

Нині багато досліджень описують клінічні характеристики пацієнтів з коронавірусною хворобою внаслідок інфікування SARS-CoV-2, включаючи епідеміологічні, клінічні, лабораторні, радіологічні та дані про лікування. Більшість цих результатів стосуються лише відмінностей між показниками пацієнтів з тяжкою та легкою формами перебігу захворювання. Але все ще недостатньо даних щодо динамічних змін параметрів клітин крові та факторів запалення для оцінки розвитку гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) і прогресування COVID-19. Імунні клітини з периферичної крові пацієнта можуть бути використані як діагностичні маркери захворювання COVID-19, які легко охарактеризувати під час швидкого та доступного аналізу крові. Але їх впровадження в клінічну практику обмежене невизначеністю механізмів, що призводять до зміни характеристик клітин крові та компонентів запалення. Як наслідок гіперактивації в системі вродженого імунітету при інфікуванні SARS-CoV-2 різко зростають рівні прозапальних цитокінів у плазмі периферичної крові, що призводить до понаднормованого вивільнення цитокінів, відомого як «цитокіновий шторм», і розвитку ГРДС, пов'язаного із пошкодженням легень і фіброзом тканини. Цей синдром «цитокінового шторму» супроводжується зниженням загальної кількості Т-клітин, Т-хелперів (CD4⁺) і цитотоксичних (CD8⁺) Т-клітин, природних кілерів (NK) і регуляторних Т-клітин, що порушує імунну систему. Тому нормалізація спричиненого COVID-19 дисбалансу імунної системи є перспективним завданням для ефективного лікування цього захворювання. Крім того, рівень та роль мікро РНК, ключових регуляторів експресії більшості генів геному людини, також недостатньо досліджені у пацієнтів з ГРДС внаслідок інфікування SARS-CoV-2. За попередніми даними, певні мікро РНК беруть участь у зменшенні запального процесу при гострій травмі легень та поляризації макрофагів в М2 стан, а також, було

показано, що експресія мікро-РНК підвищується в нейтрофілах та макрофагах на тваринних моделях.

МСК широко застосовують у клітинній терапії. Безпека та ефективність їх застосування були чітко зафіксовані у багатьох клінічних випробуваннях, особливо при імуноопосередкованих запальних захворюваннях, таких як реакція “трансплантат проти господаря” та системний червоний вовчак. В основі імуномодуючого та регенеративного ефекту МСК лежать паракринний механізм дії та пряма клітина-клітинна взаємодія. У пацієнтів з COVID-19 уникнення надпотужного «цитокінового шторму» в легенях за рахунок вивільнення цитокінів з подальшим набряком, дисфункцією повітрообміну, виникненням ГРДС, гострою серцевою недостатністю, поліорганим ураженням та вторинною інфекцією може бути ключовим аспектом в лікуванні хворих на COVID-19 із застосування МСК. Однак, нині клінічні дані, які відображають зміни в імунній системі після трансплантації МСК хворим з COVID-19, досить обмежені.

В даній роботі ми зосередилися на характеристиці динамічних змін в субпопуляціях імунних клітин в периферичній крові пацієнтів з важкою пневмонією COVID-19, опису змін ступеню пошкодження легень, аналізі рівнів цитокінів та мікроРНК в периферичній крові після трансплантації кріоконсервованих алогенних МСК пуповини та пошуку мішеней дії МСКПЛ.

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

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт лабораторії Біосинтезу нуклеїнових кислот відділу Функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконана в рамках гранту Національного Фонду Фундаментальних Досліджень, реєстраційний номер проєкту: 2020.01/0246 «Вивчення стану дихальної, серцево-судинної та імунної систем у хворих з пневмонією COVID-19 після трансплантації кріоконсервованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин» (2020 – 2021 рр.).

Об'єкт дослідження. Гострий респіраторний дистрес синдром середнього ступеню тяжкості у хворих на пневмонію, викликану коронавірусом SARS-CoV-2.

Предмет дослідження. Вплив трансплантації МСКП на перебіг ГРДС, ступінь пошкодження легень, рівні цитокінів та мікроРНК, як біомаркерів стану імунної, серцевої та дихальної системи, в периферичній крові пацієнтів з важкою пневмонією, викликану SARS-CoV-2.

Мета і завдання.

Метою роботи є охарактеризувати динамічні зміни в ступені пошкодження легень, субпопуляціях імунних клітин, рівнях цитокінів, хемокинів та мікроРНК, асоційованих із запаленням в периферичній крові пацієнтів з ГРДС внаслідок COVID-19 пневмонії після трансплантації кріоконсервованих алогенних МСК пуповини людини протягом коротко- та довготривалого терміну.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Отримати та охарактеризувати мезенхімальні стромальні клітини з пуповини людини;
2. Дослідити зміну субпопуляцій імунних клітин в крові хворих з ГРДС протягом раннього етапу перебігу хвороби;
3. Провести аналіз даних КТ легень хворих з ГРДС за консервативного лікування та клітинної терапії протягом одного року;
4. Дослідити динаміку змін рівнів С-реактивного білку, про- та протизапальних цитокінів та хемокинів (G-CSF, IL-2, IL-6, IL-10, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α) в плазмі крові хворих з ГРДС з та без клітинної терапії протягом 28 днів;

5. Дослідити динаміку змін біомаркерів гострого ушкодження легенів та серця (AngII, TnI, SP-D, NT-proBNP і RAGE) в сироватці крові хворих з ГРДС з та без клітинної терапії протягом 28 днів;
6. Провести дизайн праймерів, оптимізувати умови кількісного ЗТ-ПЛР та дослідити відносний рівень експресії і мікроРНК, асоційованих з запаленням та функціональним станом легенів та серця (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-124-3p та hsa-miR-424a-5p) в плазмі крові хворих з ГРДС з та без клітинної терапії протягом 28 днів;
7. Порівняти отримані дані функціонального стану імунної, легеневої та серцево-судинної систем з загальноклінічними даними, що характеризують перебіг пневмонії, спричиненої COVID-19;
8. Провести співкультивування моноклеарних клітин, отриманих з периферичної крові хворих з ГРДС, з МСК пуповини людини та проаналізувати зміни в розподілі субпопуляцій лімфоцитів та транскриптомі на рівні мРНК під впливом МСКПЛ.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи дослідження: виділення МСК з тканини пуповини людини, культивування МСК пуповини, світлова та флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуорометрія, спрямоване диференціювання МСКПЛ *in vitro*, ІФА, виділення моноклеарних клітин з периферичної крові людини, співкультивування МСКПЛ з МКПК, виділення тотальної РНК, виділення мікроРНК, синтез кДНК, електрофорез продуктів ПЛР, кількісна ЗТ-ПЛР в реальному часі, секвенування нового покоління, загальний аналіз крові, компютерна томографія, статистична обробка результатів.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше описано підвищений вміст CD4⁺ і CD8⁺ регуляторних, активованих, виснажених та старіючих клітин пам'яті з 14 дня спостереження. Вперше зростання вмісту подвійно позитивних Т клітин, CD127⁺- та CD25⁺-експресуючих Т-клітин, CD3⁺PD-1^{low} і CD3⁺PD-1^{low} Т-клітин, моноцитів та дендритних клітин протягом 28 днів. Вперше виявлено достовірно вищі відносні рівні експресії miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p і miR-126-3p на початку госпіталізації пацієнтів із ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. 1. Вперше виявлено, що ступінь фіброзу легень через 1 рік спостереження позитивно корелює з концентраціями MCP-1, SP-D, RAGE, вмістом старіючих Т-клітин пам'яті і CD57⁺ Т-клітин та негативно корелює з вмістом CD127⁺ клітин, рівнями експресії miR-92a-3p, miR-21a-5p і miR424-5p в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. . Встановлено, що трьохкратна внутрішньовенна трансплантація МСКП хворим на ГРДС, що спричинений SARS-CoV-2, є безпечною, не викликає суттєвих побічних негативних ефектів, має імуномодуючий вплив на перебіг запального процесу та призводить до зниження рівня фіброзу легень через 1 рік спостереження. . Виявлено, що трансплантація МСК стимулює відновлення рівня лімфоцитів та прискорює зніження таких маркерів запалення, як СРБ, ШОЕ та паличкоядерних нейтрофілів. Встановлено, що трансплантація МСК призводить до достовірного зростання в плазмі хворих вмісту протизапального цитокіну IL-10 та прозапальних хемокінів IP-10, MIP-1 α та G-CSF. Виявлено, що терапія МСК не має достовірного впливу на відносний рівень експресії мікроРНК, що асоційовані з функціональним станом легенів та запаленням (miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-126-3p, miRNA-133a-3p і miR-221-3p, miR-92a-3p, miR-124-3p і miR-424-5p) в плазмі крові хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2. Встановлено мішені дії МСКПЛ в організмі людини після введення. Досліджено транскриптом моноклеарних клітин периферичної крові пацієнтів з важкою пневмонією COVID-19 після співкультивування з МСКПЛ. Встановлено, що МСКПЛ пригнічують проліферацію МКПК хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, підвищують на МКПК рівні експресії таких маркерів ранньої активації Т

клітин як CD69 і CD25 та зменшують відсоток ефекторних CD8+ і CD4+ Т-клітин. МСКПЛ посилюють в МКПК експресію генів, асоційованих із запаленням, активацією нейтрофілів та міграцією лейкоцитів та пригнічують експресію генів, пов'язаних з реплікацією ДНК, клітинним циклом і репаративним механізмом, що було показано при розподілі диференційно експресованих генів МКПК відносно біологічних процесів і метаболічних шляхів згідно з GO та KEGG класифікацією. Запропоновано можливий механізм дії МСКПЛ на різні ланки імунної системи людини.

Практичне значення одержаних результатів. На сьогодні механізм терапевтичного впливу МСК на перебіг ГРДС, гострого ушкодження міокарду, та стан імунної системи, у хворих з COVID-19 на достатньому рівні не встановлено. Тож вивчення зміни в крові різноманітних біологічних молекул, що відображають патофізіологічні процеси, дозволить встановити мішені впливу МСК і розширити наше розуміння їх терапевтичного впливу і вдосконалити протоколи лікування. Також отримані результати досліджень розширюють наше розуміння механізму впливу МСК на імунну систему, а саме на диференціювання Т-, NK-, дендритних клітин, їх активування, динаміку змін цих процесів за різних сценаріїв перебігу COVID-19 пневмонії та, зокрема, у пацієнтів з різним функціональним станом міокарду. Вивчення стану імунної системи дозволить оцінити ризик виникнення ГРДС з гіпоактивним станом імунної системи без синдрому "цитокінового шторму" у пацієнтів з тяжкою COVID-19 пневмонією а також ефективність її лікування методом трансплантації алогенних МСК.

Особистий внесок здобувача. Основний обсяг експериментальних даних, які викладені у дисертації, отримані за безпосередньої участі її автора. Автором самостійно отримані та охарактеризовані МСКПЛ, проведено їх підготовку до трансплантації, проаналізовано результати ПЛР, проточної цитофлуориметрії та КТ. Синтез кДНК та ЗТ-ПЛР проведено у співпраці з к.б.н. І.Я. Скрипкиною, к.б.н. О.О. Маньковською та Ю.М. Шаблій. Дослідження імунофенотипу МСК та субпопуляцій клітин периферичної крові здійснено спільно з д.м.н. В.М. Кириком. Процесинг периферичної крові від пацієнтів та ІФА проведено спільно з к.б.н. В.В. Нікуліною та к.б.н. Г.М. Світіною на базі Банку пуповинної крові та інших клітин та тканин людини ТОВ «Інститут клітинної терапії» з дозволу директора С.І. Мартиненка та к.б.н. Г.С. Лобинцевої. Збір анамнезу та клінічних даних було проведено у співпраці з персоналом КМКЛ №4, а саме к.м.н. О.Л. Чибісовим та А.Р. Вегою. Дані по КТ легень отримані у співпраці з к.м.н. П.І. Немтіновим та к.б.н. А.М. Устименко. Для секвенування і первинного біоінформатичного аналізу зразки тотальної РНК з МКПК передавали компанії Novogene Co., LTD (Пекін, Китай). Планування роботи, узагальнення отриманих даних та оформлення результатів здійснено разом із науковим керівником к.б.н. В.А. Шаблієм.

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті у наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus, дві з яких опубліковані у виданнях, що належать до 1-2 кuartилів (Q1-Q2), сумарний імпакт-фактор становить 11,73:

1. Dynamic changes in radiological parameters, immune cells, selected miRNAs, and cytokine levels in peripheral blood of patients with severe COVID 19 / **Bukreieva, T.**, Kyryk, V., Nikulina, V., Svitina, H., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Mankovska, O., Lobyntseva, G., Nemtinov, P., Skrypina, I., & Shablii, V. // Biomedical reports, 2023, 18(5), 33. DOI:10.3892/br.2023.1615. **IF 2.3 Q2.** *Особистий внесок здобувача – розробка та планування дослідження, розробка методик, ІФА, аналіз даних, підготовка рукопису.*

2. Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome Caused by COVID-19 with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells / **Bukreieva, T.**, Svitina, H., Nikulina, V., Vega, A., Chybisov, O., Shablii, I., Ustymenko, A., Nemtinov, P., Lobyntseva, G., Skrypina, I., & Shablii, V. // International journal of molecular sciences, 2023, 24(5), 4435.

DOI:10.3390/ijms24054435. *Особистий внесок здобувача – розробка та планування дослідження, розробка методик, отримання, тестування, і підготовка МСКПЛ для трансплантації та експерименти зі спільним культивуванням МКПК/МСКПЛ, ІФА, аналіз даних, підготовка рукопису. IF 4.9 Q1.*

3. Effects of human placenta cryopreservation on molecular characteristics of placental mesenchymal stromal cells”. / Navakauskienė, R., Žukauskaitė, D., Borutinskaitė, V. V., **Bukreieva, T.**, Skliutė, G., Valatkaitė, E., Zentelytė, A., Piešinienė, L., & Shablii, V. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2023, 11, 1140781. DOI:10.3389/fbioe.2023.1140781. *Особистий внесок здобувача – розробка дослідження, отримання, характеристика МСК, аналіз даних, підготовка рукопису IF 4.53 Q2.*

Апробація результатів дослідження. Результати дисертаційної роботи доповідалися на конференціях: XV Всеукраїнська конференція молодих вчених з міжнародною участю (Київ, 26-27 травня 2021); Всеукраїнська конференція з молекулярної і клітинної біології з міжнародною участю // All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation (Київ, 15-17 червня 2022); CLINICAL TRANSLATION OF PERINATAL DERIVATIVES: WHERE DO WE STAND? Joint Meeting: 6th International Placenta Stem Cell Society (IPLASS) Meeting and Final Meeting of the COST Action (CA17116) “International Network for Translating Research on Perinatal Derivatives into Therapeutic Approaches” (Брешія, Італія, 02-03 вересня 2022); Конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики (Київ, 21.02.2023); Конференція молодих вчених ІМБГ у рамках XVIII Міжнародної наукової конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» присвяченої 50-річчю ІМБГ НАНУ і 70-річчю відкриття подвійної спіралі ДНК. Збірник тез. (Київ, 27 вересня 2023 року); ISSCR São Paulo International Symposium 2023, Ribeirão Preto, São Paulo, (Бразилія, 22-24 вересня 2023) та XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 21-22 травня 2024).

УХВАЛИЛИ:

1. Дисертаційна робота Букреєвої Тетяни Василівни на тему «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2», є завершеною науково-дослідною роботою та відповідає всім вимогам, які висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

2. Затвердити висновок про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи Букреєвої Тетяни Василівни на тему «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-CoV-2».

3. Рекомендувати вченій раді Інституту молекулярної біології і генетики НАН України затвердити склад разової спеціалізованої вченої ради:

Голова ради:

Оболенська Марія Юріївна доктор біологічних наук, професор, керівник групи системної біології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Рецензенти:

Півень Оксана Олександрівна, доктор біологічних наук, професор, провідний науковий співробітник відділу генетики людини ІМБГ НАН України

Герашенко Анна Володимирівна, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України.

Опоненти:

Досенко Віктор Євгенович, доктор медичних наук, професор, завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України
Сківка Лариса Михайлівна, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри Мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного Університету

Голова об'єднаного семінару
доктор біологічних наук, професор,
керівник групи системної біології
відділу ензимології білкового синтезу
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України



Марія Оболенська