

ВІДЗИВ

офіційного опонента

професора, завідувача відділу загальної та молекулярної патофізіології

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

ДОСЕНКА Віктора Євгеновича

на дисертаційну роботу

БУКРЕЄВОЇ Тетяни Василівни

«Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-COV-2», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертації та зв'язок з науковими програмами. Пандемія COVID-19 із розвитком гострого респіраторного дистрес синдрому активізувала в усьому світі вивчення проблеми ушкодження легень за участі імунної системи на молекулярному рівні із пошуком нових методів лікування та прогнозування розвитку вказаного синдрому. Дисертація Тетяни Василівни присвячена саме цьому питанню: характеристиці динамічних змін в субпопуляціях імунних клітин в периферичній крові пацієнтів з гострим респіраторним дистрес синдромом, спричиненим важкою пневмонією COVID-19, а також в зміні рівня цитокінів, хемокінів та мікроРНК після трансплантації кріоконсервованих алогенних МСК. Останній метод розглядається в науковій літературі як один з ефективних для лікування гострого респіраторного дистрес синдрому не тільки спричиненого вірусом SARS-COV-2, але й іншими інфекційними агентами. Особливу увагу дослідниця присвятила мікроРНК. Підбір панелі мікроРНК ґрунтувався на попередніх дослідженнях інших авторів, які показали, що miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-21- 5p, miR-126-3p і miR-221-3p і miRNA-133a-3p є потенційними біомаркерами запалення при гострому респіраторному дистрес синдромі, а miR-92a-3p, miR-424-5p та miR-124-3p - біомаркерами ендотеліїної дисфункції.

Виконання дисертаційного дослідження Тетяни Букреєвої було пов'язано з роботою над декількома науковими та науково-практичними темами Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, в яких вона брала участь: «Зміни транскрипційного профілю та фенотипу клітин під впливом терапевтичних агентів при онкогенній трансформації чи запаленні», шифр 2.2.4.12, відомча тематика, код 6541030 (фундаментальні дослідження) 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 галогенних мезенхімальних стовбурових клітин» (2020 – 2021 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність. Дисертанткою разом з науковим керівником точно і чітко сформульовано мету і відповідні до неї завдання, які полягали дослідженні змін рівнів С-реактивного білку, про- та протизапальних цитокінів та хемокінів (G-CSF, IL-2, IL-6, IL-10, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , TNF α), AngII, TnI, SP-D, NT-proBNP і RAGE, рівню експресії мікроРНК (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, has-miR-124-3p та hsa-miR-424a-5p) та аналізі зміни в розподілі субпопуляцій лімфоцитів та транскриптомі мРНК під впливом МСКПЛ у мононуклеарних клітинах, отриманих з периферичної крові хворих з гострим респіраторним дистрес синдромом. Поставлені завдання роботи реалізовані в повному обсязі з використанням відповідних сучасних методів досліджень. На підставі аналізу отриманих результатів досліджень із застосуванням статистичних методів були сформульовані обґрунтовані висновки та наукові положення. У тексті дисертації відсутнє порушення вимог академічної доброчесності.

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. В дисертаційній роботі Тетяни Букреєвої показано, що 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 МКПІК відносно біологічних процесів і метаболічних шляхів згідно з GO та KEGG класифікацією. В представленій роботі є низка висновків, практичних рекомендацій та наукових положень, які мають характер новизни та відображають особистий внесок дисертантки.

За результатами роботи, вперше, на молекулярно-генетичному рівні, показано комплекс порушень в імунній системі: збільшення кількості CD4⁺ і CD8⁺ регуляторних, активованих, виснажених та старіючих клітин пам'яті з 14 дня спостереження, 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 діб, збільшення 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.

Практичне значення дисертаційної роботи. Автор дослідження вважає, що вивчення стану імунної системи та рівню експресії мікроРНК 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.

Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях. Основні положення дисертації висвітлено у 3 статтях у наукових фахових журналах (Biomedical reports, International journal of molecular sciences та Frontiers in bioengineering and biotechnology), а також представлено на 7 наукових конференціях у вигляді усних доповідей і стендових презентацій.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертаційній роботі не виявлено порушень академічної доброчесності. Для всіх публікацій у співавторстві зазначено особистий внесок дисертантки.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів, що зустрічаються в тексті дисертації, мають посилання на відповідне джерело.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам. Дисертація Букреевої Тетяни Василівни оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Повний обсяг роботи викладений на 199 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, розділів результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та додатків. Список цитованої літератури включає 283 посилання, робота ілюстрована 49 рисунками та містить 4 таблиці.

Дисертанткою було детально проаналізовано достатньо велику кількість закордонних публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дослідження. Розділ **Огляд літератури** доречно структурований, охоплює висвітлення проблеми імуномодуляції із застосуванням МСК, патогенезу COVID-19 та перспективним методам лікування цієї патології.

Методи дослідження: виділення МСК з тканини пуповини людини, культивування МСК пуповини, світлова та флуоресцентна мікроскопія, проточна цитофлуориметрія, спрямоване диференціювання МСКПЛ *in vitro*, імуноферментний аналіз, 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, компютерна томографія, статистична обробка результатів із використанням програмного забезпечення SPSS версії 27.0 (SPSS Inc.).

Результати власних досліджень містять 4 розділи, кожен з яких містить підрозділи і охоплює дослідження МСК пуповини людини, динамічних змін імунофенотипу протягом хвороби, трансплантації МСК пуповини хворим, впливу МСКПЛ на моноклеарні клітини периферичної крові пацієнтів з ГРДС *in vitro*.

В розділі **Аналіз та обговорення результатів** пані Тетяною детально проведено узагальнення та аналіз отриманих результатів досліджень, спираючись та порівнюючи власні отримані результати, та результати інших груп дослідників, опубліковані у міжнародних наукових фахових виданнях. Графічно узагальнено імуномодуляторний ефект МСКПЛ *in vivo* та *in vitro* та продемонстровано, що МСКПЛ після трансплантації пацієнтам з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, призводять до зменшення ступеню пошкодження легенів і зниження кількості нейтрофілів, стимулюють лімфопоез та секрецію прозапальних цитокінів. *In vitro* модель співкультивування МСКПЛ з МКПК від пацієнтів з ГРДС виявила підвищення активації нейтрофілів, експресії ранніх маркерів Т клітин, секреції цитокінів і зниження кількості ефекторних та зрілих ефекторних CD4 і CD8 Т клітин. Завдяки цьому логічно обґрунтовано отримані **висновки** дисертаційної роботи.

Загалом позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Тетяни Букреєвої все ж виникають деякі **зауваження** та уточнюючі запитання:

1. Незрозуміло, чи варто застосовувати трансплантацію МСК усім хворим із гострим респіраторним дистрес синдромом, чи лише тим, в кого є порушення в субпопуляціях імуніцитів? Якими вони були у пацієнтів із летальним кінцем патології?

2. Чи дозволяють параметри, що вимірювалися, побачити патогенетичні ланцюжки при цьому захворюванні? Чи корелює рівень цитокінів, наприклад із змінами в експресії мікроРНК?

3. Чи можуть досліджені мікроРНК розглядатися як біомаркери захворювання чи його прогнозу? Які з них, на думку дослідниці, знайдуть застосування в практичній медицині?

Проте, запитання та зауваження, які виникли під час ознайомлення з дисертацією Тетяни Букреєвої мають лише дискусійне значення і ніякою мірою не знижують позитивної оцінки дисертації в цілому, а також викладених дисертантом основних наукових положень та висновків.

Висновок. Дисертаційна робота Букреєвої Тетяни Василівни «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-COV-2» є завершеною науковою працею, яка за актуальністю теми, новизною постановки та досліджень, теоретичними і практичними значеннями отриманих результатів, а також сучасним методичним рівнем проведених досліджень, свідчить про високі наукові досягнення здобувачки. Базуючись на вищевказаному, вважаю, що дана дисертаційна робота Букреєвої Т.В., подана на здобуття ступеня доктора філософії, повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року, а здобувачка, Букреева Тетяна Василівна, заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

професор, завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Віктор ДОСЕНКО

