

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

БУКРЕЄВОЇ ТЕТЯНИ ВАСИЛІВНИ

**«ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ
СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПУПОВИНИ НА ІМУННУ СИСТЕМУ ХВОРИХ НА
ПНЕВМОНІЮ, СПРИЧИНЕНУ КОРОНАВІРУСОМ SARS-COV-2»,**

подану на здобуття ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 «Біологія»

зі спеціальності 091 «Біологія»

Актуальність роботи.

Згідно даних ВООЗ пандемія коронавірусної хвороби 2019 (COVID-19) принесла понад 2 мільйони смертей від цієї хвороби у Європейському регіоні за кілька років з початку пандемії. І хоча більшість випадків

Більшість людей, інфікованих вірусом, переносили респіраторні захворювання легкого та середнього ступеня тяжкості та одужували, не потребуючи спеціального лікування. Однак частина з них потребувала невідкладної медичної допомоги із застосуванням сучасних методів лікування, направлених на подолання ГРДС, високого ступеня пошкодження легень та власне пневмонії.

Актуальність представленої роботи полягає у дослідженні впливу стовбурових клітин мезенхімального походження як джерела терапевтичної активності, що мають доведені імуномодельючі впливи, для розробки ефективного методу лікування запальних захворювань дихальних шляхів, ГРДС та пневмонії, спричиненої коронавірусом SARS-CoV-2. Робота Букреєвої Т.В. дозволяє побачити молекулярні впливи на рівні експресії генів, мікроРНК, маркерів різних клітин, тощо та описати потенційні механізми дії мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на стан імунної системи, стану легень хворих при COVID-19. Використані підходи дозволяють розкрити шляхи міжклітинних взаємодій при процесах запалення та регенерації, охарактеризувати динамічні зміни в субпопуляціях імунних клітин в

периферичній крові пацієнтів з важкою пневмонією, спричинену COVID-19 під впливом аллотрансплантації стовбурових клітин та без неї. Крім того, представлена робота дає змогу для розвитку та впровадження одного з напрямків сучасних методів трансплантаційної терапії при важких проявах хвороб людини, що загрожують її життю.

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

Дисертаційна робота Букреєвої Т.В. виконана у рамках науково-дослідних тем лабораторії Біосинтезу нуклеїнових кислот відділу Функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «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); 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.)

Оцінка обґрунтованості наукових результатів і висновків, сформульованих у дисертаційній роботі.

Матеріали дисертаційної роботи представлено згідно поставленої меті та завдань, які буди чітко та змістовно сформульовані. Дисертантка провела детальний огляд літератури з досліджуваної теми, що дозволило чітко визначити наукову новизну роботи та обґрунтувати поставлені завдання. У представленій роботі авторкою використано низку сучасних молекулярно-біологічних, біохімічних, клітинних методів та підходів, частина з яких ще оптимізована Букреєвою Т.В. зі співавторами, що дає змогу отримати результати високої якості. Наукові результати представлені достатнім об'ємом даних, які проаналізовано та репрезентовано за допомогою адекватних статистичних методів.

Висновки дисертаційної роботи відповідають меті та завданням дослідження, чітко відображають отримані результати, є обґрунтованими та відображають основний зміст роботи.

Наукова новизна представлених результатів, повнота викладення в опублікованих працях.

Букреевою Т.В. вперше виявлено зміни низки показників стану імунної системи, зокрема підвищений вміст CD4⁺ і CD8⁺ регуляторних, активованих, виснажених та старіючих клітин пам'яті з 14 дня спостереження у хворих на COVID-19. Вперше виявлено зростання вмісту подвійно позитивних Т клітин, CD127⁺- та CD25-експресуючих Т-клітин, CD3⁺PD-1 low і CD3⁺PD-1 high Т-клітин, моноцитів та дендритних клітин протягом 28 діб. Дослідження рівнів відносної експресії низки мікроРНК (miR-221-3p, miR-27a-3p, miR-133a-3p і miR-126-3p) дозволили виявити зростання їх рівнів на початку госпіталізації пацієнтів із ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, що може у подальшому бути досліджено як потенційні маркери більш важких станів пацієнтів. Авторкою 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. Букреевою Т.В. зі співавторами встановлено, що трьохкратна внутрішньовенна трансплантація МСКП хворим на COVID-19 з ГРДС, є безпечною, має імуномодулюючий вплив на перебіг запального процесу у легенях та призводить до зниження рівня фіброзу легень через 1 рік спостереження. Також виявлено, що трансплантація МСК стимулює відновлення рівня лімфоцитів та прискорює зниження таких маркерів запалення, як СРБ, ШОЕ та паличкоядерних нейтрофілів. Крім того, дисертанткою зі співавторами встановлено зміни рівнів низки цитокінів при трансплантації МСК, зокрема достовірного зростання в плазмі хворих вмісту протизапального цитокіну IL-10 та прозапальних хемокинів IP-10, MIP-1 α та G-CSF. Букреевою Т.В. встановлено низку мішеней дії МСКПЛ в організмі людини після введення. За допомогою РНК секвенування виявлено низку змін експресії генів у моноклеарних клітинах периферичної крові пацієнтів з важкою пневмонією COVID-19 після співкультивування з мезенхімальними стовбуровими клітинами пуповини людини МСКПЛ. Встановлено, що МСКПЛ пригнічують проліферацію моноклеарних

клітин хворих з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, підвищують рівні експресії таких маркерів ранньої активації Т клітин як CD69 і CD25 та зменшують відсоток ефektorних CD8⁺ і CD4⁺ Т-клітин. Співкультивування МСКПЛ з МКПК посилювало експресію генів, асоційованих із запаленням, активацією нейтрофілів та міграцією лейкоцитів та пригнічують експресію генів, пов'язаних з реплікацією ДНК, клітинним циклом і процесами репарації згідно з GO та KEGG класифікацією. На основі отриманих результатів авторкою запропоновано потенційний механізм дії МСКПЛ на різні ланки імунної системи людини.

Отримані результати викладені у високореєтингових міжнародних публікаціях. Опубліковано 3 статті у іноземних наукових журналах першого та другого квартилей: Biomedical reports, 2023 (Q2), International journal of molecular sciences, 2023, (Q1), Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2023, (Q2). Крім цього результати дисертаційної роботи оприлюднено на 7-и українських та міжнародних конференціях та симпозиумах.

Теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи.

Результати дисертаційної роботи Букреєвої Т.В. мають високе теоретичне та практичне значення у вивченні стану імунної системи хворих з важкими формами COVID-19 у динаміці та впливу аллотрансплантації стовбурових клітин пуповини людини на стан хворого та молекулярні показники стану імунної системи, зміни субпопуляцій клітин та потенційних механізмів міжклітинних взаємодій у стані хвороби та процесах регенерації хворих.

Крім того теоретичне значення представлена робота має у плані розширення 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. Вивчення стану імунної системи дозволило оцінити ризик виникнення ГРДС з гіпоактивним станом імунної системи без синдрому “цитокинового шторму” у пацієнтів з тяжкою COVID-19 пневмонією, а також ефективність її лікування методом трансплантації алогенних МСК.

На мою думку, найголовніше практичне значення полягає в тому, що у роботі доведено безпечність аллотрансплантації стовбурових клітин пуповини

людини хворим з важкими формами COVID-19 та наявність імуномодулюючого ефекту та позитивний довгостроковий вплив на стан легень та молекулярні показники імунної системи хворих на COVID-19.

Оцінка змісту дисертаційної роботи, мови, стилю, дотримання норм академічної доброчесності.

За своїм змістом дисертаційна робота Букреєвої Тетяни Василівни є завершеним науковим дослідженням, яке повністю відповідає вимогам, які висуваються до робіт, представлених на здобуття ступеня доктора філософії в галузі 09- Біологія за спеціальністю 091 – Біологія та напрямком досліджень відповідно до «Освітньо-наукової програми підготовки докторів філософії зі спеціальності 091- Біологія».

Порушень норм академічної доброчесності, запозичень, плагіату у представленій дисертаційній роботі Букреєвої Т.В. не виявлено.

Дисертаційна робота викладена українською мовою на 199 сторінках та має стандартну структуру й складається з анотації, вступу, огляду літератури (розділ 1), матеріалів і методів (розділ 2), результатів досліджень та обговорення отриманих результатів (розділи 3, 4, 5 і 6), аналізу та узагальнення результатів (розділ 7), висновків, списку використаних джерел та трьох додатків. Робота містить 49 рисунків та 4 таблиці, у переліку використаних джерел 283 посилання.

Більшість експериментальних результатів біологічного характеру отримано здобувачкою особисто.

У вступі відповідно до вимог викладено дані про актуальність теми дослідження, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, мету, завдання, об'єкт та предмет дослідження, методи, наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, дані про апробацію результатів дисертації, публікації, структуру та обсяг дисертації.

У першому розділі роботи докладно та інформативно проаналізовано сучасний стан питань щодо досліджень мультипотентних стовбурових клітин, їх властивостей, характеристики корона вірусної хвороби, її проявів, особливостей патофізіології хвороби та методів терапії. Представлений аналіз публікацій переважно за останні 5 років і переважають міжнародні дослідження у

рейтингових журналах. Це дає змогу адекватно оцінити сучасний стан проблем, що досліджуються.

У другому розділі вичерпно описано методи та підходи, які використано у представленій роботі. В дисертації Букреєвої Т.В. адекватно та професійно використано низку сучасних методів, зокрема, імуноферментний аналіз, проточну цитофлюориметрію, методи кількісної ПЛР та секвенування нового покоління, а також низку клітинно-біологічних методів та підходів.

Результати власних досліджень та їх обговорення представлені у наступних чотирьох розділах дисертаційної роботи. В них докладно та логічно викладено й проаналізовано згідно сучасних уявлень отримані результати. Третій розділ присвячено охарактеризуванню мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини за аналізом експресії поверхневих маркерів методом проточної цитофлуориметрії, цитогенетичним аналізом, встановлення життєздатності та колонієутворюючої активності клітин. У четвертому розділі представлено динамічні зміни імунофенотипу пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 в розрізі характеристики протікання хвороби. Встановлено профілі субпопуляцій лімфоцитів у пацієнтів, динамічні профілі змін субпопуляцій Т-клітин та субпопуляцій мієлоїдних мононуклеарів. У п'ятому розділі представлено результати трансплантація мезенхімальних стовбурових клітин пуповини хворим з пневмонією і ГРДС внаслідок COVID-19. Описано стан хворих та низку імунологічних та молекулярних показників (рівні цитокінів, мікроРНК, ощо) до та після проведення аллотрансплантації та без неї протягом 28 діб та 48 тижнів. Досліджено кореляції між гематологічними параметрами, цитокінами, мікроРНК і показниками КТ легень у групі з введенням стовбурових клітин. У шостому розділі представлено дані щодо впливу кріоконсервованих мезенхімальних стромальних клітин пуповини людини на мононуклеарні клітини периферичної крові пацієнтів з ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 *in vitro*. Зокрема, зміни імунофенотипу мононуклеарних клітин периферичної крові хворих, рівнів цитокінів та кількості клітин при спів культивуванні, зміни в експресії генів мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнтів до та після спів

культивування згідно результатів секвенування та класифікацій баз даних GO та KEGG.

У розділі 7 представлено аналіз та узагальнення отриманих результатів, де чітко представлено основні досягнення та найважливіші результати дослідження і доведено, що в результаті виконання дисертаційної роботи було встановлено, що трьохкратна внутрішньовенна трансплантація МСКП з інтервалом в 3 доби в дозі $1 \cdot 10^6$ клітин/кг маси тіла на ранній/середній стадії захворювання на ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2, є безпечною, не викликає суттєвих побічних негативних ефектів, має імуномодуючий вплив на перебіг запального процесу та призводить до суттєвого зниження рівня фіброзу легень (в 12 разів) через 1 рік спостереження. Також представлено узагальнену схему імуномодуляторного ефекту введення мезенхимальних стовбурових клітин пуповини людини *in vivo* та *in vitro*.

Висновки, наведені в дисертаційній роботі, в цілому відповідають поставленій меті та завданням, адекватно висвітлюють основні результати досліджень.

Список використаних джерел складається з 283 посилань на джерела у вітчизняних і міжнародних виданнях.

Таким чином, дисертація Букресвої Тетяни Василівни відповідає існуючим вимогам та є завершеною науковою працею, результати якої вирішують актуальну наукову задачу сучасної молекулярної біології та мають високе теоретичне та практичне значення.

Зауваження до дисертаційної роботи:

Наявні нечисленні друкарські помилки, зокрема С.8 «запалення»; С.97 – у назві підрозділу скорочення «мск» маленькими буквами, тоді як треба «МСК»; С.99. у назві «5.3. Динаміка змін гематологічних у пацієнтів з з ГРДС» «пацієнтів із з ГРДС»; С.116 «рецептру»; С.140. «Встановлена негативна кореляція між кількістю мієлоїдних ... клітин та ...,».

На С.70 спочатку представлена Таблиця 2.2, а лише на С. 71 подано посилання на неї – повинно бути навпаки – спочатку посилання, а потім сама таблиця.

С.71-72 – використовують то скорочення ФБС, то FBS. ФБС скорочення – не зовсім адекватно перекладено з англійської FBS (Fetal Bovine Serum) (яке використовується на с.71, 72) – українською більш правильно було б - Ембріональна бичача сироватка.

С.75 – помилка з посиланням, яке не знайдено.

С.79 Мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) – скорочення не внесено до списку скорочень.

С.80 – EDTA- не внесено до списку скорочень, хоч і є широковідомим реагентом.

С.81 Вираз «чисті дані» стосовно первинних частково оброблених даних секвенування не дуже вдалий.

С.82 – Рис.3.1.- було б добре вказати одиниці вимірювання на осях.

С.99 Крім того не дуже вдала назва для груп пацієнтів із ГРДС, спричиненим SARS-CoV-2 як «контрольна група» та пацієнтів з трансплантацією як «МСК група». Зазвичай як «контрольну» групу беруть здорових людей як на с.108 – є група «здорових волонтерів»

С.99 «порівняння всередині групи: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001 \dots$ » - цей текст краще було винести у підпис до відповідних рисунків рис.5.2, рис.5.3 та рис.5.6) як і в інших випадках (Рис.5.18-5.20 та інші) – у форматі підписів під рисунками це легше сприймається при ознайомленні з результатами на рисунках, хоч і займає більше місця.

С.134 – дискусійне використання терміну «Профіль транскриптому» у назві Рис.6.4. Досліджувались транскрипти кодуючих білки генів, тоді як термін «транскриптом» більш прийнятно використовувати для досліджень де і кодуючі і некодуючі РНК досліджуються.

В основному висновку та далі у висновках «у хворих з ГРДС...» а в назві роботи «хворі з пневмонією, спричиненою...» - було б більш адекватно або в назві роботи вказувати «ГРДС», або у висновках – «пневмонію».

Більшість зауважень стосується недоліків оформлення, або не зовсім вдалих виразів. Але вказані зауваження не впливають на змістовну та наукову частину роботи та її високу позитивну оцінку.

Дискусійні питання:

1. С.132 «Для визначення змін в експресії генів були порівняні профілі транскриптомів моноклеарних клітин периферичної крові (МКПК), отриманих від хворих на коронавірусну пневмонію, культивованих спільно з мезенхімальними стромальними клітинами пуповини людини (група МСК) і без них (Контрольна група)» - Не розумію яка кількість зразків крові хворих використана у цьому експерименті? У матеріалах та методах було вказано 6 біологічних повторів – а по групам як?

2. Дані по РНК секвенуванню дають великий об'єм даних згідно з GO та KEGG класифікацією, з яких важко вичленити окремі гени та зробити значущі висновки, враховуючи невелику кількість біологічних повторів у експерименті. Але з іншого боку ці дані цінні тим, що дають можливість оцінити ті напрямки, за якими треба рухатись у подальших дослідженнях, щоб отримати дійсно значущі результати. Яким чином ви плануєте рухатись у цьому питанні?

3. За результатами Вашої роботи, як Ви вважаєте, зміни у яких типах клітин мають найбільший вплив на ГРДС та запалення при дії МСК?

4. Чи має сенс встановлення особливостей змін експресії генів у окремих субпопуляціях імунних клітин у хворих з ГРДС при співкультивуванні зі стовбуровими клітинами? І чи встановлювали Ви окремо профілі експресії генів у самих МСК при культивуванні окремо без клітин хворих?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Букресвої Тетяни Василівни «Особливості впливу мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин пуповини на імунну систему хворих на пневмонію, спричинену коронавірусом SARS-COV-2», представлене на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» є самостійною завершеною науковою працею, що

містить новітні наукові положення, які обґрунтовані отриманими результатами та не порушує принципів академічної доброчесності.

За методичним рівнем виконання, обсягом проведених досліджень, науковою новизною результатів, повнотою публікацій матеріалів дослідження, їх апробації на наукових конференціях дисертаційне дослідження повністю відповідає галузі знань 09- Біологія, спеціальності 091- Біологія та сучасним вимогам, які висуваються до дисертацій, затвердженим наказом МОН України «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» від 12 січня 2017 р. №40 та положенню Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», » (зі змінами, внесеними згідно із постановою Кабінету Міністрів України №341 від 21.03.2022р. та постановою Кабінету Міністрів України №502 від 19.05.2023р.), а її авторка заслуговує присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 - «Біологія».

Рецензент:

Провідний науковий співробітник
відділу молекулярної онкогенетики,
доктор біологічних наук,
старший дослідник ІМБГ НАН України

Ганна ГЕРАЩЕНКО