

ВІДГУК

офіційного опонента

завідувачки кафедри мікробіології та імунології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

докторки біологічних наук, професорки **СКІВКИ Лариси Михайлівни**

на дисертацію **БУКРЕЄВОЇ Тетяни Василівни**

на тему: «ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ

МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПУПОВИНИ

НА ІМУННУ СИСТЕМУ ХВОРИХ НА ПНЕВМОНІЮ, СПРИЧИНЕНУ

КОРОНАВІРУСОМ SARS-COV-2»,

подану на здобуття ступеня доктора філософії

в галузі знань 09 «Біологія»

за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертації.

Пневмонія, спричинена інфекцією SARS-CoV-2, стала основною причиною загибелі пацієнтів з важкою формою хвороби під час пандемії COVID-19, що зумовило необхідність поглибленого вивчення механізму цього патологічного стану з метою пошуку патогенетичних методів лікування і засобів його профілактики. Так уперше пильна увага світової спільноти була прикута до феномену гіперзапалення, яке лежить в основі гострого респіраторного дистрес синдрому, асоційованого з коронавірусною пневмонією. Гіперзапалення являє собою неконтрольовану активацію ефекторів вродженої імунної реактивності з надпродукцією запальних медіаторів (у т.ч. цитокіновий шторм), які викликають системну васкулярну патологію з утворенням мікротромбів і наступним порушенням перфузії та множинним ушкодженням органів. Незважаючи на

значні зусилля численних дослідницьких груп, ефективні засоби лікування гіперзапалення досі відсутні. Золотий стандарт протизапальних засобів – нестероїдні протизапальні препарати – на жаль, виявилися недієздатними у лікуванні гіперзапалення, асоційованого з коронавірусною пневмонією. Отже проблема пошуку/розробки таких препаратів залишається невирішеною. Підвищена увага до гіперзапалення, асоційованого з коронавірусною пневмонією, сприяла розширенню існуючих уявлень щодо самого феномену неконтрольованого запалення, яке властиве не лише інфекційним процесам, а й низці інших патологічних станів: онкологічній патології, автоімунним захворюванням, патологічній реакції на адоптивну імунотерапію тощо. У всіх цих випадках комплексне лікування потребує контролю запалення з використанням ефективних протизапальних засобів, які не викликали б стану імуносупресії, створюючи ризик розвитку опортуністичних інфекцій, а, натомість, зберігали б патрульну функцію імунної системи. Сама по собі коронавірусна інфекція та асоційована з її важкою формою пневмонія також досі не втратили актуальності, оскільки з'являються нові варіанти вірусу зі здатністю уникати імунного нагляду не лише за рахунок пригнічення синтезу інтерферонів І типу, а й із залученням інших механізмів, а також ініціювати постінфекційні автоімунні процеси. Це зайвий раз підкреслює необхідність у протизапальних засобах неімуносупресивного характеру.

Одним з таких засобів є мезенхімальні стромальні клітини пуповини, відомі своїм широким спектром продукованих протизапальних медіаторів і ростових факторів, які забезпечують їх потужний потенціал у стимуляції і підтримці репаративних і регенеративних процесів. Терапевтичний потенціал мезенхімальних стромальних клітин пуповини для контролю запалення наразі широко досліджується. Результати таких досліджень засвідчують перспективність застосування мезенхімальних стромальних клітин пуповини для контролю гіперзапалення, що, у свою чергу, потребує поглибленого вивчення мішеней їх імуномодуляторної дії та механізмів протизапальних

ефектив. Саме цим питанням присвячена дисертаційна робота Тетяни Василівни Букреєвої і саме вони визначають високий ступінь її актуальності за теоретичними і практичними аспектами.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами.

Дисертаційна робота виконана на базі лабораторії Біосинтезу нуклеїнових кислот відділу Функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України в рамках відомчої тематики фундаментальних досліджень «Зміни транскрипційного профілю та фенотипу клітин під впливом терапевтичних агентів при онкогенній трансформації чи запаленні». Змістове наповнення дисертаційної роботи цілком узгоджується із зазначеною тематикою. Крім того, дисертаційні дослідження виконувалися 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.).

Оформлення дисертації та дотримання академічної доброчесності.

Рукопис дисертації Букреєвої Тетяни Василівни написаний українською мовою з використанням адекватної професійної лексики і фахової термінології, а також оформлений відповідно до наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (із змінами, внесеними згідно з наказом Міністерства освіти і науки України № 759 від 31 травня 2019 року). Загальний обсяг рукопису становить 199 сторінок, з яких 147 сторінок займає основний текст. Рукопис має класичну структуру і включає анотації українською та англійською мовами, список публікацій (10 найменувань), зміст, перелік умовних скорочень, вступ, розділ "Огляд літератури" (який складається з трьох підрозділів), розділ "Матеріали та методи досліджень" (який містить 16 підрозділів), розділ результатів власних

досліджень, що включє чотири підрозділи, розділ аналізу та узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел і додатки. Робота проілюстрована 49 рисунками, 4 таблицями та 3 додатками, а бібліографія включає 283 джерела, більшість з яких датується не пізніше, ніж 10-річним терміном.

Концепція дисертаційного дослідження чітко сформульована, мета і завдання викладені стисло і лаконічно.

Результати перевірки та аналізу матеріалів дисертаційної роботи Букреєвої Тетяни Василівни не виявили ознак академічного плагіату, автоплагіату, фальсифікації. Запозичення, наявні у роботі, оформлені коректно з посиланнями на першоджерела та не мають ознак порушення академічної доброчесності.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Дисертаційне дослідження Букреєвої Тетяни Василівни виконано на високому методичному рівні із застосуванням комплексної методології, яка за останнє десятиліття переконливо довела свою максимальну ефективність щодо реалізації мети і завдань дисертаційних досліджень у галузі знань 09 «Біологія». Зокрема з метою формування груп учасників дослідження використано молекулярно-генетичні методи для діагностики коронавірусної інфекції з верифікацією ступеню тяжкості патологічного стану методом томографічної візуалізації. Наступна група методів включала культуральні і цитологічні методи отримання, пасажування, спрямованого диференціювання, кріоконсервації та депонування мезенхімальних стромальних клітин пуповини. Співкультивування виділених методом зонального центрифугування моноклеарних лейкоцитів периферичної крові з мезенхімальними стромальними клітинами пуповини з наступним РНК-секвенуванням для оцінки транскриптому та біоінформатичним аналізом застосовано для дослідження імуномодуляторних ефектів останніх в умовах *in vitro*. Імуноферментний аналіз для дослідження розчинних медіаторів лейкоцитів, ЗТ-ПЛР для оцінки мікро РНК і проточну цитометрію для

імунофенотипування лейкоцитів периферичної крові використано з метою оцінки імуномодуляторних ефектів мезенхімальних стромальних клітин пуповини *in vivo*. Висновки, сформульовані в роботі, ґрунтуються на значному фактичному матеріалі з наступним комплексним статистичним аналізом отриманих даних, достовірність їх не викликає сумнівів.

Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи.

Вперше у клінічному дослідженні показано протифіброзний ефект застосування трансплантації мезенхімальних стромальних клітин пуповини у хворих з інфекцією SARS-CoV-2, ускладненою наявністю гострого респіраторного дистрес-синдрому. Переконливі докази такого ефекту відкривають перспективи застосування цього виду клітинної терапії у комплексному лікуванні патологічних станів, пов'язаних з фіброзом легень, таких як автоімунні хвороби (ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, поліміозит, склеродерма тощо).

Розширено існуючі уявлення щодо особливостей та механізмів протизапальної дії мезенхімальних стромальних клітин пуповини. Дослідження протизапальних ефектів з деталізацією впливу на розчинні медіатори запалення та клітини-ефектори запальних та гіперзапальних реакцій в динаміці терапії створює підґрунтя для маніпуляції режимом її застосування.

Отримано нові дані стосовно епігенетичного контролю гіперзапалення. Автором вперше застосовано визначення комплексу мікро РНК, який раніше не застосовувався у контексті моніторингу його кількісних показників в динаміці гострого респіраторного дистрес-синдрому у хворих з інфекцією SARS-CoV-2. Результати цієї частини роботи сприяють виявленню мікроРНК, які можуть слугувати терапевтичними мішенями для контролю гіперзапалення, у т.ч. з використанням мезенхімальних стромальних клітин пуповини.

За результатами дисертаційного дослідження вперше детально досліджено зміни популяційного складу лейкоцитів з різним функціональним

станом, субпопуляційного складу Т-клітин з різним функціональним станом, а також кількісних показників різних субпопуляцій міелоїдних мононуклеарних клітин периферичної крові хворих з інфекцією SARS-CoV-2 з моменту госпіталізації в динаміці гострого респіраторного дистрес-синдрому. Результати цього етапу дисертаційної роботи можуть бути використані для встановлення кінетики синдрому системної запальної відповіді та синдрому компенсаторної протизапальної відповіді, що розширює існуючі знання кінетики гіперзапалення в цілому і представляє значний інтерес з точки зору мінімізації ризику формування «вікна гіпореактивності імунної системи», яке підвищує імовірність розвитку опортуністичних інфекцій і набуття поліморбідності патологічним станом.

Особливої уваги з точки зору наукової новизни дисертаційного дослідження Букреєвої Тетяни Василівни заслуговує вивчення транскриптому мононуклеарних лейкоцитів периферичної крові після співкультивування з мезенхімальними стромальними клітинами пуповини та його біоінформатичний аналіз, який окреслює нові аспекти механізму імуномодуляторної дії цього виду клітинної терапії.

Важливим елементом рецензованого дисертаційного дослідження є також результати кореляційного аналізу взаємозв'язку між біомаркерами гіперзапалення та клінічними показниками гострого респіраторного дистрес-синдрому, що дозволяє встановити причино-наслідкові взаємозв'язки між цими двома феноменами.

Практичне значення результатів дослідження.

Результати дисертаційної роботи науково обґрунтовують безпечність і терапевтичну ефективність трансплантації мезенхімальних стромальних клітин пуповини у комплексній терапії гострого респіраторного дистрес-синдрому у хворих з інфекцією SARS-CoV-2 з розшифруванням окремих механізмів їх біологічної активності *in vitro* та *in vivo*. Отримані дані окреслюють перспективи

подальшого дослідження цього виду клітинної терапії у комплексному лікуванні гіперзапалення.

Результати дисертаційної роботи Букреєвої Тетяни Василівни можуть бути використані в навчальному процесі підготовки фахівців у галузі біомедицини та біотехнології освітнього рівня магістр і доктор філософії.

Апробація результатів дисертації, повнота викладу основних положень, висновків і рекомендацій в опублікованих працях.

Основні результати дисертаційної роботи опубліковано у 10 наукових працях: 3 статтях у закордонних журналах, що індексуються наукометричною базою Scopus (Q1 та Q2), та 7 тезах доповідей у матеріалах міжнародних вітчизняних та зарубіжних наукових конференцій.

Основні здобутки дисертаційної роботи також достатньою мірою оприлюднені на 7 міжнародних наукових форумах. Це засвідчує визнання результатів дисертаційної роботи міжнародною фаховою науковою спільнотою.

Дискусійні положення та зауваження

1. Формулювання окремих положень наукової новизни є стилістично невдалим.
2. В огляді літератури та/або у розділі аналізу та обговорення власних даних варто було більше уваги приділити характеристиці ролі досліджених мікро РНК у розвитку та регуляції (гіпер)запалення.
3. В описі деяких методів відсутні значущі деталі. Зокрема, відсутнє посилання на першоджерело методу отримання мезенхімальних стромальних клітин пуповини. У разі, якщо це авторська розробка, необхідно було це зазначити.
4. В описі взяття зразків крові не зазначено, чи проводився забір натщесерце і не вказано, який тип антикоагулянту використовувався: для всіх випадків цитрат калію чи, можливо, були застосовані різні антикоагулянти.
5. В оформленні деяких рисунків і підписів до них допущено помилки і

бракує деяких даних. Наприклад, на рисунку 5.2. варто було додати референтні межі досліджених гематологічних показників. На багатьох рисунках доцільно було додати розшифрування використаних скорочень, що значно спростило б їх сприйняття. Підписам до багатьох рисунків бракує деталізації.

6. У розділі аналізу та узагальнення варто було більшою мірою використати опубліковані дані стосовно клінічних досліджень застосування мезенхімальних стромальних клітин пуповини для контролю інфекційного та асептичного запалення. Посилання на публікації такого типу в обговорення доволі обмежені.
7. У рукописі присутні окремі термінологічні помилки.

Слід зазначити, що висловлені зауваження не носять принципового характеру, не стосуються концепції дисертаційного дослідження і не впливають на його загальну позитивну оцінку.

У порядку дискусії до авторки виникли наступні **запитання**:

1. На якому терміні хвороби пацієнти госпіталізувалися до лікарні і наскільки стандартизованою була група учасників дослідження за цим критерієм?
2. Чим керувалися при виборі однократної та сумарної дози мезенхімальних стромальних клітин пуповини та режиму їх введення пацієнтам з гострим респіраторним дистрес-синдромом?
3. Підвищені сироваткові рівні N-кінцевого пропептиду натрійуретичного гормону В-типу і С-реактивного білка є незалежними маркерами порушення кардіореспіраторної активності у пацієнтів із серцевою недостатністю. Чому, на Вашу думку, у хворих на SARS-CoV-2-інфекцію з гострим респіраторним дистрес-синдромом виявилася доволі сильна негативна кореляція між цими показниками?
4. Яким є Ваше особисте ставлення до методології трансплантації мезенхімальних стромальних клітин пуповини з ескалацією їх дози?

5. У хворих на SARS-CoV-2-інфекцію з гострим респіраторним дистрес-синдромом трансплантація МСКПЛ спричиняла зниження сироваткового рівня інтерлейкіну-6. Натомість співкультивування мононуклеарних лейкоцитів з МСКПЛ *in vitro* викликало посилення синтезу цього цитокіну. Чим Ви можете пояснити цей феномен?

Висновки про відповідність дисертації встановленим вимогам.

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 кваліфікаційною науковою працею, яка за актуальністю тематики, високим методичним рівнем, ступенем новизни отриманих результатів та їх практичним значенням, повнотою викладення отриманих даних в опублікованих наукових працях повністю відповідає вимогам п. 6, 7, 8, 9 «Про затвердження 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 12.01.2022 року, а її авторка Т.В.Букреєва заслуговує присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

Докторка біологічних наук, професорка
Завідувачка кафедри мікробіології та імунології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
Міністерства охорони здоров'я України

Лариса СКІВКА