

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, професора, професора кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ

на дисертаційну роботу

ПІКУС ПОЛІНИ ОЛЕКСІЇВНИ

**«РОЗРОБКА СПОСОБІВ ПОСИЛЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ
ЕФЕКТИВНОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН»**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії
зі спеціальності 091 «Біологія і біохімія»

Актуальність теми дисертації. Використання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) різного походження в терапії патологій залишається до сьогодні актуальним. Незважаючи на зростання чисельності доклінічних та обмежених клінічних випробувань із застосуванням терапії МСК для різних захворювань людини, не існує надійних протоколів ефективної терапії. Тому, використання МСК в клінічній практиці потребує створення адекватних доклінічних моделей на експериментальних тваринах з індукованими патологіями. Також важливим є мішенева доставка МСК в тканини та органи, де локалізовано патологічний вузол. Широко використовуваними тканинами для виділення МСК є ті, які піддаються біологічній утилізації, зокрема це тканина плаценти, пуповинного канатика, пуповинної крові та жирова тканина. В представленій дисертаційній роботі було поставлено наступні мету та завдання, які зосереджені на розробці та удосконаленні способів посилення терапевтичної ефективності МСК пуповини людини та дослідженні ефективності МСК з посиленням терапевтичним потенціалом на тваринних моделях деяких захворювань, таких як гострого перитоніту, цирозу печінки, панкреатиту, індукованих у щурів та мишей.

Отже, дисертаційна робота Пікус Поліни Олексіївни «Розробка способів посилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин»

присвячена розробці методів посилення довгочасної виживаності МСК, секреції терапевтичних сполук цими клітинами, захисту їх від впливу запального середовища з використанням інкапсуляції МСК в мікрокапсули з безпечних напівпроникних матеріалів, а також прекондиціонуванню МСК, яке здатне посилювати їх терапевтичний потенціал та прискорювати терапевтичний ефект МСК при різних захворюваннях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Пікус Поліни Олексіївни виконана в рамках наукового проекту відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення біологічних особливостей альтернативних станів МСК желе Вартона пуповини людини», (номер держреєстрації 0117U003913, що виконувалась протягом 2018-2022 рр).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність. Отримані в дисертаційному дослідженні Пікус П.О. наукові положення, науково-практична новизна, висновки і рекомендації є обґрунтованими та достовірними, отриманими на великій вибірці експериментального матеріалу з використанням сучасних методів дослідження, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. В дисертаційній роботі Пікус Поліни Олексіївни отримані новітні дані, які поглиблюють уявлення про можливість впливати на терапевтичний потенціал МСК пуповини людини, посилюючи його, шляхом таких маніпуляцій як інкапсуляція в гідрогелі та прекондиціонування, зокрема, низькою дозою пероксиду гідрогену.

В дисертаційній роботі на моделі цирозу у щурів, який індукований введенням тетрахлорметаном (CCl_4), вперше проведено порівняння терапевтичного ефекту МСК пуповини людини, що інокульовані системно у вигляді суспензії, і МСК, які інкапсульовані в альгінатні мікрокапсули. Було показано більш високу ефективність інкапсульованих МСК у відновленні печінки. На моделі стерильного гострого запалення черевної порожнини у

мишей вперше вивчена динаміка розвитку протизапального ефекту МСК та на основі цих даних розроблено швидкий і відтворюваний спосіб визначення терапевтичної ефективності МСК, який дозволяє порівнювати в однакових умовах ефективність різних препаратів МСК. Вперше обґрунтовано переваги прекондиціонування МСК низькою дозою пероксиду гідрогену, яке призводить до значного підвищення терапевтичного потенціалу МСК. Доведено, що взаємодія перитонеальних макрофагів з прекондиціонованими МСК у порівнянні з вихідними МСК призводить до більш швидкої поляризації прозапальних макрофагів М1 фенотипу у протизапальний фенотип М2, що викликає більш інтенсивну експресію *IL - 10* і, відповідно, посилення фагоцитозу. На моделі гострого панкреатиту у щурів індукованого високою дозою L-аргініну вперше показано можливість відновлення структури та функції підшлункової залози щурів вдвічі швидше шляхом трансплантації прекондиціонованих МСК пуповини людини у порівнянні з трансплантацією вихідних МСК.

Практичне значення дисертаційної роботи. Результати дослідження були впроваджені в лабораторії генно-клітинних модифікацій відділу генних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАН України». Спосіб індукції низькими дозами пероксиду гідрогену МСК пуповини були запропоновані та впроваджені у науково-дослідну роботу в відділі регуляторних механізмів клітини Інституту Молекулярної Біології і Генетики НАН України; у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та в лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАМН України. Крім того, розроблена тест-система, яка дозволяє порівнювати терапевтичний потенціал різних препаратів МСК пуповини людини може бути використана для швидкого та ефективного залучення до обмежених доклінічних дослідженнях за патологій печінки та підшлункової залози.

Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.

За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць: 5 статей у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, що входять до міжнародних наукометричних баз, та 6 тез у збірках міжнародних конференцій, які, зокрема, були представлені на міжнародних форумах: «Horizons in Molecular Biology» (Гьотинген, Німеччина, 2018 р.); 45th FEBS Congress, (Любляна, Словенія, 2021 р.); XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019 р.); All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation (Київ, Україна, 2022 р.); IUBMB–46th FEBS–PABMB Congress (Лісабон, Португалія, 2022 р.); The Conference of Young Scientists of XVIII International Conference (Київ, Україна, 2023 р.). Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело. Виконані спільні дослідження з іншими авторами відмічені в спільних публікаціях та подяках. Оригінальний текст дисертантки становить 88%.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.

Дисертація Пікус Поліни Анастасії Олександрівни оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Дисертацію викладено українською мовою на 154 сторінках комп'ютерного тексту. Робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», розділу «Результати експериментальних досліджень», розділу «Аналіз та узагальнення результатів», висновків та списку використаних джерел, який налічує 301 посилання, переважно за останні 5 років. Роботу проілюстровано 24 рисунками та 6 таблиць.

В розділі **Огляд літератури** висвітлено роль та властивості МСК людини, виділені із біологічного матеріалу, що підлягає утилізації і відповідно не потребує пакетів дозвільної документації на роботу з цим матеріалом. Однак існує велика кількість нюансів щодо сертифікації МСК, які в залежності від джерела та способу виділення мають значні відмінності, що викликає труднощі в оцінці їх біологічних властивостей і можливості використання для клітинної

терапії. Міжнародним товариством з клітинної терапії було запропоновано та узагальнено мінімальні критерії для характеристики МСК людини, що пропонуються для клітинної терапії різних патологій. Згідно цих параметрів, МСК повинні бути адгезивними до пластику при введенні в культуру, мати високий рівень експресії таких маркерів, як *CD 105*, *CD 73* та *CD 90* і водночас, повну відсутність маркерів гематопоетичних стовбурових клітин таких як *CD45*, *CD34*, *CD14* або *CD11b*, *CD79a*, або ж їх кількість не повинна перевищувати 2%. Такі характеристики МСК потребують стандартизованих методів їх виділення та створення способів доставки клітин в місця патологій.

Підрозділи розділу Огляд літератури присвячені характеристиці джерел виділення МСК людини, і, зокрема увагу дисертантки зосереджено на характеристиці МСК пуповини, їх здатності до диференціювання, взаємодії з імунною системою акцепторів МСК. Можливість неінвазивного збору МСК із пуповини та їх імунотолерантність мають перевагу в клінічному використанні. Ефективність терапії МСК із пуповини перевіряються в лікуванні гематологічних захворювань, кардіоваскулярних патологій, за регенерації хрящів та кісток, лікування ран, дефектів зору, цукрового діабету, нейродегенеративних захворювань, терапії інсульту, терапії захворювань печінки, терапії аутизму, тощо.

Однак, багаточисельні дослідження демонструють імуносупресорну активність МСК як результат пригнічення активності імунних клітин як вродженого, так і адаптивного імунітету. Більшість із отриманих даних стосовно імуномодуляторних властивостей МСК продемонстровано в дослідженнях *in vitro* за кокультивування МСК і клітин імунної системи.

Тому питання щодо локальної доставки МСК в організм та запобігання їх імуносупресивним якостям залишається відкритим. Для посилення терапевтичної ефективності МСК використовуються різні способи, зокрема це прекоондиціювання, застосування екзосом, що можуть реалізувати свій імуномодулюючий потенціал через функціональні зміни моноцитів/макрофагів, дендритних клітин, Т-клітин, В-клітин та природніх клітин-кілерів.

Саме способам підсилення терапевтичної направленості МСК за їх введення в організм присвячена дана дисертаційна робота.

Розділ **Матеріали та методи дослідження** побудовано за традиційною схемою, складається із переліку використаного обладнання, матеріалів та методів дослідження, серед яких переважають методи клітинної інженерії, зокрема виділення та культивування МСК пуповини людини, отримання та характеристика перитонеальних макрофагів мишей, інкапсуляція МСК. Інші методи об'єднані в групи молекулярно-біологічних - виділення сумарної РНК, експресія генів білків за допомогою ЗТ-ПЛР, гель-електрофорез білків, проточна цитофлуориметрія, світлова мікроскопія; мікробіологічних - культивування штамів *E.coli*, визначення фагоцитарного індексу макрофагів; морфофункціональних - гістологічні методи дослідження, морфологічні та морфометричні методи, біохімічних та гістохімічних методів. В розділі Матеріали і методи описані експериментальні моделі індукованих патологій: цироз печінки у щурів з використанням тетрахлорметану, гострого перитоніту за інтраперитонеального введення 3% розчину протеозного пептону та панкреатиту, індукованого введенням L-аргініну. Усі досліди на тваринах проводили відповідно до Постанови Президії Методичних рекомендацій з біоетичної експертизи наукових досліджень, проведених на тваринах (Національний комітет з біоетики при Президії НАН України, 2006 р.). Дослідження схвалені Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України, що вони не суперечать біоетичним аспектам поводження з лабораторними тваринами. Також представлений використаний в дослідженні підрозділ статистичної обробки даних з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism версії 8.0.1. («GraphPad Software», США) та MS Excel («Microsoft»). Порівняння за участю трьох та більше груп з нормально розподіленими вибірками проводили за допомогою ANOVA з наступною оцінкою одностороннього дисперсійного аналізу та за допомогою критерію адитивності Тьюкі. Результати представлені у вигляді середнього значення показника $\pm$ середньостатистичне відхилення. Для тестів $p < 0,05$ та $p < 0,01$ вважалося значущим.

В розділі **результати експериментальних досліджень та обговорення** представлено моделювання в експерименті трьох патологій: цирозу печінки, гострого перитоніту та панкреатиту та використання мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини в якості терапії. МСК, отримані із пуповини людини, для подальшої інокуляції експериментальним тваринам, були підготовлені попередньо прекондиціонування з різними агентами природнього та синтетичного походження та інкапсульовані в альгінатні капсули, що дозволяло проводити поступове вивільнення МСК в місце введення капсул.

Перед процедурами підсилення ефективності МСК, клітини перевіряли на наявність маркерів та диференціувального потенціалу. Було показано здатність МСК до диференціювання у три основні напрямки: хондрогенне, остеогенне та адипогенне та наявність експресії поверхневих маркерів МСК: *CD90*, *CD73*, *CD105*, рівень експресії яких становив $\geq 99\%$, і майже повну відсутність експресії *CD34*, *CD45* $\leq 0,4\%$.

Модель індукованого тетраклорметаном цирозу печінки у щурів підтверджена у перші тижні після його введення гістологічними дослідженнями з фіксацією суттєвих змін в структурі паренхіми печінки, а саме утворенням псевдоглобул в паренхімі печінки щурів та експресією генів *EGF*, *α -SMA*, *GFAP* та *eNOS*. Для вивчення впливу МСК на цирозну печінку було обрано дві форми: суспензія МСК, яку вводили системно, та МСК, що були інкапсульовані в альгінатні капсули та вводились інтраперитонеально. Ефективність терапії порівнювали в динаміці через 3, 8 та 13 тижнів після обох способів введення МСК і було показано, що фіброз печінки зникає протягом 13 тижнів після трансплантації МСК, а основні показники печінки нормалізуються. Експресія генів, пов'язаних з пошкодженням печінки та розвитком фіброзу, також повертається до норми, як після системного введення МСК пуповини людини, так і після інтраперитоніального введення інкапсульованих МСК. Але відновлення печінки за інтраперитоніального введення інкапсульованих МСК була ефективнішою, ніж при системному введенні МСК.

На моделі гострого перитоніту у мишей, яке було викликано

інтраперитонеальним введенням розчину протеозного пептону дослідження динаміки розвитку терапевтичної дії прекондиційованих пероксидом гідрогену МСК після їх інтраперитоніального введення показало, що протизапальний ефект розвивався дуже швидко порівняно з іншими чинниками прекондиціювання такими як мелатонін, аскорбінова кислота, ЛПС та γ -Інтерферон.

Також за гострого панкреатиту у щурів, який було індуковано інтраперитонеальним введенням L-аргініном в короткий термін після трансплантації МСК з'явилися ознаки відновлення підшлункової залози щурів, особливо в групі, в якій вводили прекондиційовані МСК у порівнянні з вихідними МСК, що проявлялось у практично повному відновленні панкреатоцитів, структурно-функціональних особливостей екзокринної та ендокринної частин підшлункової залози. За трансплантації МСК знижувалась секреція колагену, який є основним компонентом позаклітинного матриксу, що пригнічувало формування фіброзу підшлункової залози. В результаті проведених досліджень на моделі гострого панкреатиту у щурів виявлено, що введення МСК відновлює як структуру паренхіми підшлункової залози, так і її функцію, знижуючи рівень альфа-амілази в крові щурів і відновлюючи функціонування острівців Лангерганса. Отже отримані результати в дисертаційній роботі Поліни ПКУС на моделях цирозу печінки та гострого панкреатиту у щурів та запального перитоніту у мишей демонструють високу терапевтичну ефективність МСК пуповини людини у інгібуванні гострих запальних процесів та сприяють регенерації та відновленню ушкоджених тканин.

Наведені **Висновки**, відображають мету та завдання даного дослідження, логічно впливають із проведеного дослідження, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах. В результаті проведеного дослідження отримано нові дані, які стосуються можливості суттєвого підсилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини шляхом прекондиціювання низькими дозами пероксиду гідрогену та інкапсуляції МСК в альгінатні капсули.

Результати ефективності трансплантації модифікованих МСК доведено на трьох тваринних моделях запальних захворювань- гострого панкреатиту та перитоніту та цирозу печінки.

Однак в ході рецензування роботи виникло ряд запитань та уточнень, на які хотілось би почути відповідь від дисертантки:

- *При моделюванні гострого панкреатиту на щурах відмічено високу смертність у тварин. Скажіть, це стосувалось лише експериментальних груп чи групи негативного контролю без введення МСК?*
- *Системне питання: Ви моделювали патології у мишей та щурів, а використовували МСК пуповини людини- тобто йде мова про аlogenну трансплантацію МСК? А чи відомі Вам результати застосування сингенних МСК на тваринних моделях з гострим запаленням, або ж на інших патологіях, наприклад, канцерогенез, ішемія, кардіоваскулярні патології, ретинопатія, тощо?*
- *Відомо, що за введення алогенного матеріалу, імуногенність в організмі акцептора є достатньо високою? Можете підтвердити чи спростувати моє твердження. І якщо Ви досягали імунотолерантності за введення МСК то яким чином?*
- *І наступне питання, в клінічному застосуванні МСК людини використовують проти патологій людини? Щодо використання МСК людини проти патологій, індукованих у експериментальних тварин, що є основним побічним ефектом у відторгненні МСК в організмі тварин?*
- *Чи були в експерименті групи умовного контролю, де тваринам не індукували запалень, а просто вводили МСК, і чи спостерігали в такому випадку відмінності з інтактним контролем?*
- *Яким чином за введення інкапсульованих МСК, Ви стандартизували альгінатні капсули, зокрема по вмісту клітин або ж за розміром власне капсул?*

- *І при цьому, чи були співрозмірними концентрації МСК введені системно, внутрішньовенно та перитонеально (інкапсульовані) за індукованого тетраклорметаном цирозу печінки?*
- *Як ви аналізували морфометричні показники гепатоцитів (зрізи, цитологічні препарати)? І яким чином відрізняли фіброзну тканину від паренхіми печінки?*
- *На мій погляд не зафіксовано різниці за цирозу печінки між різними способами інокуляції МСК: введенням в альгінантних капсулах та внутрішньовенною трансплантацією, зокрема за морфометричними показниками. Поясніть будь ласка? І чи спостерігали ви збільшення/зменшення багатоядерних гепатоцитів після введення МСК в порівнянні з позитивним та негативним контролем?*
- *Який біологічний ефект прекодиціонування МСК пероксидом гідрогену? Відомо, що пероксид гідрогену є проапоптичним фактором, і чи відомо Вам в яких концентраціях ця сполука індукує апоптоз?*
- *На рис.3.8 не зовсім вдало наведено різницю між групами $^{\#}P<0,5$ – позитивного контролю в порівнянні з вихідними МСК/ прекодиціонованими пероксидом гідрогену МСК. Поясніть будь ласка суть різниці, в динаміці/ зміні основним показників, що свідчать про протизапальні ефекти?*
- *Запальні процеси при перитоніті за введення МСК ви фіксували лише за концентрацією макрофагів в ексудаті, чи були якісь додаткові показники?*
- *Фенотип M2 макрофагів Ви підтверджували лише за експресією IL-10? І чи відомі Вам інші маркери M2 фенотипу макрофагів?*
- *При порівнянні різних факторів, що застосовувались для прекодиціонування МСК Ви вказуєте, що найбільш ефективним методом підвищення терапевтичного потенціалу МСК є прекодиціонування низькими дозами пероксиду гідрогену. А чи може цей метод бути ефективним та прийнятним в клінічному застосуванні?*
- *Яким чином обраховували площу колагену у моделях гострого панкреатиту та цирозу печінки щурів?*

- *Оскільки, Ви працювали із патологіями, що характеризувались гострим запаленням, чи використовувались уніфіковані показники, які б свідчили про ефективність протизапальної терапії після використання МСК в різній модифікації?*
- *Варто також відмітити, що в дисертаційній роботі зустрічаються неточності в наукових термінах, «англіцизми», складно побудовані речення, помилки правопису, тощо.*

Проте наведені зауваження та уточнюючі запитання не знижують цінність проведеного фундаментального дослідження, що має високу науково-практичну цінність, яка стосується використання МСК в різних потенційно значимих в терапевтичному використанні модифікаціях проти запальних процесів, індукованих в експерименті.

Отже, наукові положення, висновки та фактичний матеріал наведені в дисертації Пікус Поліни Олексіївни «Розробка способів посилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин», є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу експериментальних досліджень, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом, узагальненням отриманих даних та висновками, які відповідають поставленій меті та завданням. Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики при роботі з біологічним матеріалом, отриманим із пуповини людини з метою виділення МСК та щодо гуманного поводження з теплокровними тваринами в експерименті.

Висновок. Дисертаційна робота Пікус Поліни Олексіївни «Розробка способів посилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин» є завершеним науковим дослідженням, що за актуальністю теми, новизною досліджень, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів, а також сучасним методичним рівнем проведених досліджень, свідчить про високі наукові досягнення здобувачки. Базуючись на вищевказаному, вважаю, що дисертаційна робота Поліни ПІКУС подана на здобуття ступеня доктора філософії, повністю відповідає 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 здобувачка заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія та Біохімія

Офіційний опонент:

Доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри зоології та екології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Людмила ГАРМАНЧУК