

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктор біологічних наук., зав. лабораторії імуногенетики відділу
гематології та трансплантології Інституту клінічної радіології Державної
установи «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та
онкології Національної академії медичних наук України»

МІНЧЕНКО ЖАННИ МИКОЛАЇВНИ

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»

Сучасний розвиток регенеративної медицини нерозривно пов'язаний з вивченням біології стовбурових клітин різного походження, які розглядаються як джерело самовідновлення тканин і органів людини. Безперечні факти позитивних посттрансплантаційних ефектів підсилення спроможності регенераційних процесів в ушкоджених органах і тканинах при застосуванні клітинних структур, отриманих з різних джерел, дозволили переглянути цілий ряд біологічних догматів ембріогенезу, онтогенезу і окреслило перспективність застосування нових програм імунотерапії, зокрема, клітинної терапії. Особливі надії покладаються на використання в клінічній практиці програм терапії з МСК, оскільки вони мають певну імунну толерантність та не потребують сумісності з тканинами реципієнта. Порівняння властивостей МСК, що отримані з різних джерел, показало, що МСК ізольовані з пуповини людини є наймолодшими дорослими стовбуровими клітинами, володіють мультипотентною пластичністю, більш вираженою імуносупресивністю, мають більш активну проліферацію ніж дорослі клітини з кісткового мозку та жирової тканини, що розширює спектр впливу на різні системи організму і сприяє підвищенню регенеративного потенціалу органів і тканин. Насьогодні,

до найбільш прогресивних наукових напрямків в галузі трансплантології відносять пошуки шляхів підвищення терапевтичного ефекту МСК.

Незважаючи на досить великі успіхи досягнень в даному напрямку ціла низка важливих наукових питань лишається невирішеною, зокрема в світовій практиці дуже обмежено представлені дані щодо оцінки ступеню підсилення терапевтичного ефекту мезенхімальних стовбурових клітин за умов використання стратегії прекондиціонування та інкапсуляції МСК в мікрокапсули.

Саме цим питанням і присвячений науковий напрямок, обраний дисертантом для дослідження, який безумовно є актуальним і перспективним в розвитку не тільки з позицій отримання нових наукових надбань, але і з позицій формалізації біотехнологічних підходів до підвищення терапевтичного потенціалу МСК у визначенні інформативних критеріїв оцінки ступеню спроможності терапевтичного потенціалу досліджених клітин, як маркерів моніторингу на різних етапах терапії. на тваринних моделях запальних захворювань.

Наукова новизна. У дисертаційній роботі на моделі цирозу печінки за умов порівняльного аналізу терапевтичної ефективності системного введення МСК та інтраперитонеального введення інкапсульованих в альгінатні капсули МСК пуповини людини отримано нові дані, щодо можливості значного підсилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини шляхом прекондиціонування низькими дозами пероксиду водню та інкапсуляції МСК в альгінатні мікрокапсули. В роботі представлено нові дані щодо взаємодії МСК з інтраперитонеальними макрофагами *in vivo* і доведено факт їх поляризації в протизапальний фенотип M2, що висвітлює наявність імунних механізмів підсилення терапевтичного ефекту МСК на рівні корекції запальних реакцій. Розроблено нові біотехнологічні підходи до проведення порівняльного аналізу терапевтичного потенціалу препаратів МСК на різних етапах запалення і запропоновано алгоритм оцінки їх терапевтичної

ефективності для підбору оптимальної дози фактору, яким здійснюється прекондиціонування МСК пуповини людини.

Практичне значення одержаних результатів.

На основі визначення інформативних критеріїв оцінки ступеня і часу відновлення структурно-функціональних порушень: маркерні гени, накопичення колагену, гістоморфологічні, біохімічні та імунологічні параметри паренхіми органу на моделі цирозу печінки щурів, розроблено алгоритм оцінки рівня терапевтичного потенціалу різних препаратів МСК пуповини людини, а запропонований автором алгоритм лабораторного дослідження в до- та післятрансплантаційному періодах можуть скласти основу для подальшої розробки протоколів оцінки ступеню спроможності терапевтичного потенціалу досліджених клітин, як маркерів моніторингу на різних етапах терапії.

Результати дослідження були впроваджені в лабораторії генно-клітинних модифікацій відділу генних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАН України». Також прекондиціоновані механізмальні стовбурові клітини пуповини людини з низькою дозою H_2O_2 були впроваджені у роботу в відділі регуляторних механізмів клітини Інституту Молекулярної Біології і Генетики НАН України, також у роботу в 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.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в рамках наукових проектів відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Вивчення біологічних особливостей альтернативних станів МСК желе Вартона пуповини людини», (реєстраційний номер 0117U003913, 2018-2022 рр).

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою самостійно проведено аналіз наукової літератури, виконано основний об'єм експериментальних досліджень, проаналізовано отримані результати, проведено статистичну обробку даних. Спільно з науковим керівником було визначено мету та завдання, схему експериментів, а також узагальнено результати та обговорено висновки дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації були представлені та обговорені на міжнародних конференціях: «Horizons in Molecular Biology» (Гьотинген, Німеччина, 2018 р.), 45th FEBS Congress, Molecules of Life, (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 within the framework of XVIII International Conference «Factors in Experimental Evolution of Organisms» (Київ, Україна, 2023 р.).

Оприлюднення результатів дисертаційної роботи. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць: 5 статей у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, які входять до міжнародних наукометричних баз та 6 тез у збірках міжнародних конференцій. Публікації свідчать про надійну апробацію дисертації з боку експертно спільноти.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність.

Дисертаційна робота методологічно побудована коректно як за дизайном досліджень, так і за спектром імуно-біологічних показників. В роботі автором застосована оригінальна модель дослідження та особисті модифікації протоколів з відпрацюванням найбільш інформативних параметрів для розробки алгоритму оцінки терапевтичного потенціалу різних препаратів МСК. Використання сучасних експериментальних методів у сукупності з застосуванням оригінальних і

модифікованих технік, прискіпливий порівняльний аналіз з представленими в світовій практиці розробками в даному напрямку, а також вагоме оприлюднення отриманих даних на сторінках фахових наукових журналів свідчать про достовірність отриманих результатів та обґрунтованість наукових висновків, які повністю відповідають меті і завданням роботи.

Дисертаційна робота є результатом особистих досліджень здобувачки і не містить ознак фальсифікації, компіляції та запозичень інших дослідників.

Обсяг і структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 154 сторінці 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. Робота містить 24 рисунки та 6 таблиць.

Огляд літератури представляє собою логічний аналіз сучасного стану вивчення проблеми, з відображенням суперечливих та мало вивчених питань, що є обґрунтуванням вибору наукового напрямку дослідження. Зокрема, автором розглянуті питання ефективності трансплантації МСК, можливі причини низького виживання культивованих клітин, високої швидкості апоптозу, що знижують їх терапевтичний ефект. Розглянуті різні протоколи, включаючи прекондиціонування, яке може впливати на біологічну активність МСК *in vitro* та *in vivo*, тим самим значно підвищуючи ефективність відновлення на різних моделях захворювань.

В розділі матеріали і методи досліджень надана характеристика дослідженого біологічного матеріалу, хімічних агентів, матеріалу для культуральної роботи, лабораторним тваринам, обладнанню. Логічно та послідовно описані методи дослідження. Автором висвітлені методологічні підходи до одержання моделі ураження печінки щурів та дослідження

терапевтичного потенціалу вихідних та інкапсульованих МСК пуповини людини на моделі цирозу печінки у щурів при різних методах введення. Цінним є те, що автор використав модифіковані оригінальні протоколи досліджень.

Результати досліджень. Розділ складається з трьох основних підрозділів, кожний з яких також розділено на підрозділи. В підрозділах послідовно представлені незаперечні факти щодо відмінностей характеру відновлення вихідних та інкапсульованих МСК пуповини людини на моделі цирозу печінки у щурів при різних методах введення. Результати роботи свідчать, що МСК, впливаючи на печінку через паракринні, імуномодулюючі, антифібротичні механізми сприяють її відновленню, а інкапсуляція МСК посилює їх терапевтичний ефект. Результати, отримані автором демонструють, що ін'єкція МСК, навіть у низьких дозах призводить до поляризації макрофагів у протизапальний фенотип M2 і до швидкого відновлення після гострого абдомінального запалення у мишей. Автором представлена методика оцінки терапевтичної ефективності препаратів МСК *in vivo*. На моделі гострого панкреатиту у щурів, індукованого високою дозою L-arg, було продемонстровано терапевтичний ефект МСК пуповини людини, як вихідних, так і прекондиціонованих, що виражається у відновленні структури та функції підшлункової залози.

Розділ 4 присвячений аналізу та узагальненню отриманих результатів і вміщує обговорення результатів досліджень, який включає оцінку даних за усіма підрозділами у співставленні з світовими набутками в цієї галузі. Викладення матеріалу свідчить про високу професійну обізнаність дисертанта, а також про прогресивне наукове мислення при трактовці отриманих результатів і в контексті формування майбутніх гіпотез відносно формалізації біотехнологічних підходів до підвищення терапевтичного потенціалу МСК.

Відносно оформлення дисертаційної роботи слід зазначити, що вона викладена хорошою академічною українською мовою добре проілюстрована. Разом з тим, існує певна кількість неточностей і помилок в тексті, але вони не

мають принципового значення. Усі зазначені зауваження та поставлені питання, що виникли в процесі рецензування, не впливають на позитивне враження від роботи та не зменшують її теоретичного та практичного значення.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли деякі **дискусійні питання**:

1. В роботі Ви зазначили, що розроблено біотехнологічні аспекти швидкого та ефективного способу визначення та порівняння *in vivo* терапевтичного потенціалу різних препаратів МСК, але у висновках сам дизайн алгоритму досліджень не висвітлено. Охарактеризуйте спектр основних критеріїв розробленого Вами алгоритму, чим Ваш методологічний підхід відрізняється від існуючих методів, і які переваги він має.

2. Відомо, що значний вплив на якість терапевтичного ефекту МСК визначає якість самих клітин, що обумовлює необхідність стандартизації терапевтичних МСК за функціональними критеріями. Чи сформовано на сьогодні в світовій практиці спектр критеріїв для паспортизації функціональної якості МСК і якими критеріями Ви користувались при відборі клітин.

Заключення на дисертаційну роботу Пікус Поліни Олексіївни «Розробка способів посилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини», представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії, є закінченою науковою працею, за актуальністю і новизною, науковою концепцією і методичними підходами виконання характеризується як високопрофесійна робота, яка має перспективи розвитку. Робота 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

завідувач лабораторії імуногенетики
відділу гематології та трансплантології
ДУ «Національний науковий центр
радіаційної медицини, гематології та
онкології НАМН України»
доктор біологічних наук, професор

Ж.М. Мінченко