

РЕЦЕНЗІЯ

офіційного рецензента – кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і

генетики НАН України Мацевич Лариси Леонідівни

на дисертацію Пікус Поліни Олексіївни

«Розробка способів посилення терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин»,

подану до захисту у разову спеціалізовану вчену раду в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України

на здобуття наукового ступеня доктора філософії

у галузі знань 09 – «Біологія» за спеціальністю 091 – «Біологія та біохімія»

Актуальність теми дисертації

Дисертаційна робота П.О. Пікус присвячена розробці способів посилення терапевтичної ефективності МСК пуповини людини та дослідженню ефективності МСК з посиленням терапевтичним потенціалом на тваринних моделях деяких захворювань.

Вибір теми дослідження добре обґрунтований, а її актуальність не викликає сумнівів. В цілому, застосування МСК в клінічній практиці має значний потенціал, оскільки, з одного боку, мають високий власний регенеративний потенціал, реалізація якого регулюється їх мікрооточенням – з іншого ж, і самі здатні опосередковано впливати на регенерацію довколишніх тканин через вивільнення позаклітинних месенджерів, таких як хемокіни, цитокіни, фактори росту та нуклеїнові кислоти. Цей потенціал підтверджується численними обнадійливими даними лабораторних досліджень на експериментальних моделях.

Проте перехід до клінічних випробувань в більшості випадків не демонструє достатньо високої ефективності, яка могла б підтвердити доцільність використання МСК при даному типі патології. Причинами такого феномену, звичайно, можуть бути і недосконалість експериментальних моделей, і значна

кількість сторонніх факторів, це впливає на ефективність лікування пацієнтів в гуманній медицині – проте, зі значною долею ймовірності, найбільший вклад вносять особливості процесу масової продукції лікувальних препаратів, що містять первинні МСК. Так, протоколи культивування первинних клітин людини не дозволяють досягнути високого рівню стандартизації; також значна гетерогенність характеризує і сам клітинний матеріал, отриманий від значної кількості донорів.

Проте розробка виробничих процедур для збереження та посилення регенеративних та регенераторних властивостей МСК є одним зі шляхів подолання згаданих перешкод до їх успішного клінічного використання. Все це робить пошук і всебічне дослідження ефективності таких процедур, важливим і актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконана у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Вона відповідає основному плану НДР відділу та виконувалась у рамках бюджетної теми «Вивчення біологічних особливостей альтернативних станів МСК желе Вартона пуповини людини», (реєстраційний номер 0117U003913, 2018-2022 рр).

Загальна структура дисертації

Дисертацію викладено українською мовою на 153 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. Роботу проілюстровано 22 рисунками та 6 таблицями.

Аналіз основного змісту роботи

Перший розділ дисертації – літературний огляд, присвячений МСК людини та їх потенційному клінічному застосуванню. Спочатку охарактеризовано загальні властивості МСК людини. Описано джерела отримання донорських МСК, що використовуються в лабораторній та клінічній практиці. Окремо описано особливості МСК пуповини людини, котрі є основним об'єктом наукового інтересу в даній роботі, їх імуномодуючі властивості, відомості про їх міграцію в організмі реципієнта, методи адресної доставки. Узагальнено існуючі дані про можливості посилення терапевтичних властивостей МСК – зокрема, мікрокапсулювання та прекодиціювання.

Огляд літератури актуальний, добре організований і справляє позитивне враження та свідчить про хороше володіння автором темою свого дослідження.

В наступних розділах представлено результати власних досліджень автора.

У другому розділі «Матеріали і методи» описано основні експериментальні підходи, що використовувались у дослідженнях. Наведено детальні протоколи моделювання цирозу печінки, гострого панкреатиту та нестерильного гострого перитоніту на моделях з використанням лабораторних гризунів *in vivo*. Описано методи виділення та культивування МСК пуповини людини, способи їх інкапсуляції та прекодиціювання. Описано способи та протоколи введення МСК при експериментальному лікуванні всіх трьох досліджуваних патологій. Також наведено протоколи оцінки стану здоров'я експериментальних тварин та лабораторні методи, що використовувалися для вивчення ефективності регенераторних властивостей МСК: гістологічного аналізу тканин, морфометричного аналізу, гістохімічного забарвлення, ЗТ- ПЛР, біохімічного дослідження крові та оцінки життєздатності перитоніальних макрофагів, визначення фагоцитарної активності перитоніальних макрофагів. Також наведено методи, що використовувалися для статистичної обробки отриманих даних.

Третій розділ роботи присвячений розробці способів отримання препаратів МСК з посиленими терапевтичними властивостями. Для цього спочатку було

оптимізовано та охарактеризовано експериментальні моделі цирозу печінки на щурах лінії Wistar, а також гострого панкреатиту та нестерильного гострого перитоніту у мишей лінії BALB/c, розроблено ефективні методи контролю розвитку патології та ефективності її лікування.

Для вивчення впливу МСК на циротичну печінку було обрано дві форми: МСК – суспензія клітин, яку вводили системно, та МСК, що були інкапсульовані в альгінатні капсули, та були введені інтраперитоніально. 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 швидкість відновлення таких параметрів, як кількість колагену, рівень експресії *EGF*, α – *SMA* була вищою при трансплантації інкапсульованих МСК, ніж при системному введенні

На моделі гострого перитоніту у мишей було проведене порівняльне дослідження різних методів прекодиціювання МСК на їх безпосередню взаємодію з клітинами реципієнта – а саме, йшлося про прекодиціювання за допомогою мелатоніну, аскорбінової кислоти, ЛПС, γ -інтерферону та перекису водню. Єдиним методом, що сприяв підвищенню ефективності взаємодії МСК з перитонеальними макрофагами, виявився H_2O_2 в концентрації 30 мкмоль. Таке прекодиціювання сприяло змінам, що є частиною механізмів реалізації терапевтичної дії МСК. Фактичне посилення терапевтичної дії МСК було в подальшому підтверджене на моделі гострого панкреатиту: за даними біохімічного та гістологічного аналізу, протизапальний та відновлювальний ефект МСК, які прекодиювані H_2O_2 , розвивався вдвічі швидше, ніж у варіанті з вихідними МСК.

Таким чином в результаті виконання дисертаційної роботи було отримано нові дані щодо можливості статистично значущого підсилення терапевтичного ефекту МСК пуповини людини – як шляхом інкапсуляції МСК в альгінатні мікрокапсули (доведено на моделі цирозу печінки у щурів), так і через

прекондиціонування H_2O_2 (на моделі гострого перитоніту у мишей і гострого панкреатиту у щурів). Вперше розроблено біотехнологічні аспекти швидкого та ефективного способу порівняння терапевтичного потенціалу різних препаратів МСК.

Концептуально важливим є прикінцевий четвертий розділ роботи, в якому аналізуються та узагальнюються отримані результати. В ньому описано загальну логіку і послідовність етапів дослідження, проведено порівняння різних аспектів біологічної та терапевтичної дози препаратів МСК, отриманих за різними технологіями.

Достовірність отриманих результатів

Достовірність результатів дисертаційної роботи не викликає сумнівів. Вона підтверджується як застосуванням адекватного поставленій задачі комплексу сучасних експериментальних дослідницьких методів. Вони включають, зокрема, набір стандартних методів молекулярної та клітинної біології, клінічної біохімії та гістології (виділення та культивування МСК пуповини людини, гістологічного аналізу тканин, морфометричного аналізу, гістохімічного забарвлення, ЗТ-ПЛР, біохімічного дослідження крові та оцінки життєздатності перитоніальних макрофагів, визначення фагоцитарної активності перитоніальних макрофагів).

В роботі коректно проведено статистичну обробку отриманих даних. Використані методи дозволили одержати достовірні результати, на яких ґрунтуються зроблені в роботі висновки.

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків дисертації

Мета й завдання дослідження чітко сформульовані, а матеріали дисертації викладено у повній відповідності з ними. Автором проведений ґрунтовний аналіз літератури за темою дисертаційної роботи, що дозволило виявити наукову новизну отриманих результатів. Застосування вказаних вище сучасних методів дало змогу розв'язати ті проблеми, що лежали в основі проведеного дослідження.

Наукові положення та висновки дисертації добре обґрунтовані й відповідають отриманим результатам. Висновки роботи чітко сформульовані та

висвітлюють її основний зміст.

Наукова новизна роботи

Наукова новизна дисертаційної роботи достатньо очевидна. Зокрема: отримані результати поглиблюють уявлення про керований вплив на терапевтичний потенціал МСК пуповини людини шляхом інкапсуляції в гідрогелі та прекондиціонування H_2O_2 ;

- вперше проведено порівняння терапевтичного ефекту МСК пуповини людини при системному введенні клітинної суспензії та при місцевому застосуванні інкапсульованих в альгінаті МСК, і показано більш високу ефективність цих останніх у відновленні печінки;

- вперше вивчена динаміка розвитку протизапального ефекту МСК та розроблено швидкий і відтворюваний спосіб визначення терапевтичної ефективності МСК з високим рівнем стандартизації;

- вперше обґрунтовано терапевтичні переваги прекондиціонування МСК низькими концентраціями H_2O_2 ;

- вперше показано можливість суттєвого прискорення відновлення структури та функції підшлункової залози щурів шляхом використання прекондиціонованих МСК замість вихідних МСК.

Практичне значення отриманих результатів

Результати дослідження були впроваджені в лабораторії генно-клітинних модифікацій відділу генних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАН України». Також прекондиціоновані за описаною в роботі технологією мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини були запропоновані та 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. Крім того, розроблена тест-система, яка дозволяє порівнювати терапевтичний потенціал різних препаратів МСК пуповини людини може бути використана як ефективний скринінг-тест в доклінічних дослідженнях.

Повнота викладу основних результатів роботи в опублікованих працях

За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць: 5 статей у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України (всі в журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), та 6 тез у збірках міжнародних конференцій.

Це свідчить про високий рівень роботи, наукову новизну й вагомість отриманих результатів.

Підсумкова оцінка змісту дисертаційної роботи

У загальному підсумку, дисертація справляє дуже позитивне враження – як завдяки дуже значному обсягу проведення експериментальних досліджень, так і через ґрунтовний та коректний аналіз отриманих даних. Застосовано різні підходи до виконання роботи, використано широкий спектр експериментальних методів.

Все це дозволило розробити перспективні підходи, що сприяли б використанню регенераторного потенціалу донорських МСК в клінічній практиці, зокрема, в регенеративній медицині.

Отримані результати мають як фундаментальну наукову, так і практичну цінність. Вони вносять вагомий внесок у наші знання про модуляцію біологічної активності МСК, механізми реалізації їх регенераторного потенціалу. Результати зможуть знайти застосування в дослідженнях у науках про життя та в медичній біотехнології. Сформульовані автором мета й завдання роботи успішно реалізовані, а висновки роботи повністю обґрунтовані. Дисертація якісно та коректно оформлена.

В цілому, ця дисертаційна робота є зрілою науковою працею, з високоактуальною темою. Вона виконана на сучасному експериментальному й

теоретичному рівні, завдяки чому отримано нові цікаві результати, важливі для розвитку біології та медицини.

Дискусійні положення, зауваження та запитання до дисертації

Робота за своїм змістом, результатами і глибиною їх аналізу є дослідженням високого рівня. Принципових зауважень до неї немає, а серед окремих зауважень і запитань можна навести наступні:

- 1) У розд. 2.1.2 вказано смертність тварин в процесі моделювання патології. Рекомендується також вказати на смертність в контрольній групі (точніше, на відсутність такої), а також навести аналогічні показники для інших тваринних моделей (розд.2.1.1 та 2.1.3).
- 2) Рекомендовано додати критерії, за якими визначали успішний розвиток патології, в розд. 2.1.1 - 2.1.3.
- 3) У розд. 2.2 у фразі "Адипогенний, остеогенний і хондрогенний потенціал диференціації МСК пуповини людини перевіряли за допомогою набору для диференціації StemPro®" рекомендовано вказати, за яким протоколом це робили (очевидно, це протокол виробника?). Так само - в розд. 2.4.2 та 2.4.3, де йдеться про виділення РНК та реакцію зворотної транскрипції; в розд. 2.4.5 (активність альфа-амілази) - тобто, в усіх місцях, де використовувалися фірмові кіти, вказати, чи використовувалися рекомендації виробника, чи інший протокол (і який саме)
- 4) Так само рекомендовано додати посилання на протоколи гістологічного забарвлення
- 5) У розд.2.2.1 рекомендовано вказати концентрацію розчину трипсину
- 6) В тому ж розділі рекомендовано виправити формулювання "29-G шприц" на коректнішу - "шприц з голкою діаметром 29G"
- 7) Також не рекомендовано вживати позначення "0 точка", як таке, що не відповідає загальноприйнятій нормі, і замінити його на "нульова точка" чи "точка 0".
- 8) У розд. 2.4.10 рекомендовано вказати, за допомогою якого методу проводилася оцінка нормальності розподілу.

- 9) Також рекомендовано уточнити в термінологічному словнику української мови, чи формулювання "однонаправлений дисперсійний аналіз" є коректним, оскільки воно виглядає як калька з англійської мови (раніше вживалося формулювання "однофакторний дисперсійний аналіз", яке, на думку рецензента, більш точно описує суть цього методу)
- 10) Невдалою видається також фраза "Для тестів $p < 0,05$ та $p < 0,01$ вважалося значущим": адже $p < 0,01$ є підмножиною $p < 0,05$, тому достатньо вказати лише цей останній рівень значущості. Якщо ж в одних тестах приймався рівень значимості $p < 0,05$; а в інших - $p < 0,01$, то варто переформулювати процитоване речення саме таким чином, вказуючи, де саме який рівень значущості застосовувався.
- 11) На рисунки з фото гістологічних препаратів рекомендовано додати стрілки, що вказують на об'єкти інтересу (так, як це зроблено на рис. 3.11)
- 12) У розд. 3.1.2.1. раптово з'являється згадка про часткову гепатектомію ("Це свідчить про те, що часткова гепатектомія, яку проводили тваринам, не стимулює відновлення печінки"); тоді як ані в методичній частині не наведено протоколу операції, ані в описі експерименту не вказано, до яких саме тварин застосовували цю процедуру.
- 13) Таблицю 3.2 (дані морфометрії) рекомендується переформувати таким чином, щоб можна було побачити динаміку показників;
- 14) В одних експериментах як терапевтичний агент використовувались інкапсульовані МСК; а в інших - прекондиційовані. Рекомендовано коротко обґрунтувати вибір препарату МСК для терапії конкретної патології
- 15) Рекомендовано об'єднати рис. 3.14 і 3.15 в один рисунок. Так само - рис. 3.19 і 3.20
- 16) В заголовку табл. 3.4 рекомендовано вказати, про яку часову точку йдеться.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
Дисертаційна робота Пікус Поліни Олексіївни «Розробка способів посилення

терапевтичної ефективності мезенхімальних стовбурових клітин», подана на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 - «Біологія» за спеціальністю 091 - «Біологія та біохімія» є самостійною завершеною науковою працею, що містить новітні наукові положення, 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 біохімія» 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 21.03.2022 та постановою Кабінету міністрів України 502 від 19.05.2023 р.), а її авторка Пікус Поліна Олексіївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 "Біологія" 091 - "Біологія та біохімія".

Офіційний рецензент:

ст.н.с., к.б.н. відділу генетики
людини Інституту молекулярної
біології і генетики НАН України

Лариса Мацевич