

Відгук офіційного опонента

На дисертаційну роботу Іродова Д.М. « Дослідження терапевтичного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин в умовах синдрому полі органної дисфункції на тлі тривалого токсичного ураження організму»,
представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Розвиток регенеративної медицини нерозривно пов'язаний з вивченням біології стовбурових клітин різного походження, які розглядаються як джерело самовідновлення тканин і органів людини. Отримані результати дозволили переглянути цілий ряд біологічних догматів ембріогенезу, онтогенезу і регенерації тканинних і клітинних структур при трансплантації стовбурових клітин, отриманих з різних джерел. Особливі надії покладаються на використання в клітинній терапії МСК, оскільки вони мають певну імунну толерантність та не потребують сумісності з тканинами реципієнта. Результати доклінічних і клінічних випробувань дозволили виділити три основних напрямки застосування МСК в програмах терапії вибору: підтримка гемопоезу, заміщення та відновлення функції ушкоджених негемопоетичних тканин (кісток, хрящів, скелетних і серцевих м'язів, нервової тканини, печінки і т.д.); пригнічення імунних конфліктів при неродинній трансплантації та тяжких аутоімунних процесах. За механізмами впливу, на системи гемопоезу і імунопоезу встановлено, що дія МСК, не є лінійно-специфічною, сприяє в рівній мірі проліферації мієлоїдних та лімфоїдних клітин і реалізується через вивільнення цитокінів, які регулюють приживлення (SDF1), проліферацію і диференціювання кроветворних клітин.

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 можливості досягнення терапевтичного ефекту за умов використання мезенхімальних стовбурових клітин при синдромі поліорганної дисфункції, що виник в результаті хронічного токсичного ураження організму. Саме вивченню цих питань і присвячений науковий напрямок, обраний автором, який є безсумнівно актуальним і перспективним, оскільки розробка підходів виведення організму із стану саморуїнування і переводу його в стан ефективного самовідновлення з

використанням екзогенних МСК є невід'ємною складовою подальшого розвитку даної галузі як с фундаментальних так і з прикладних позицій. Хочу підкреслити, що 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.

Наукова новизна. Вперше було розроблено оригінальну модель синдрому поліорганної дисфункції в результаті тривалого ураження токсичним ксенобіотиком на тваринах із спадковою схильністю до канцерогенезу. Окреслені можливості потенціальної терапевтичної дії трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин при зазначеному стані і визначені основні закономірності формування терапевтичного ефекту в залежності від фізіологічних, біохімічних та гістопатоморфологічних характеристик, які підтверджують стан еСПОД у модельних тварин. Показано залежність терапевтичного ефекту трансплантації МСК від видових варіантів МСК, від дози введених клітин і кратності трансплантацій. Вперше показано, що МСК, трансплантовані модельним тваринам з наявністю спадкової схильності до канцерогенезу, не впливають на ризик реалізації новоутворень.

Практичне значення одержаних результатів. Створена та охарактеризована модель може використовуватися при вивченні перебігу системних уражень та пошуку терапевтичних засобів. Отримані дані свідчать про потенціал використання МСК для терапії системних уражень і мають практичну цінність для подальших розробок терапії синдрому поліорганної дисфункції, а запропонований автором алгоритм лабораторного дослідження в до- та післятрансплантаційному періодах можуть скласти основу для подальшої розробки *протоколів* лабораторного супроводу при зазначених станах.

Зв'язок роботи з науковими програмами та темами.

Дослідження проведені в рамках науково-дослідних робіт відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за темами «Перетворювальний потенціал нативних та модифікованих стовбурових клітин (СК) і його реалізація *in vitro* і *in vivo*» (реєстраційний номер 0112U007302, 2009-2013 р.р.) та «Вивчення сигнальних міжклітинних взаємодій в культурі та організмі мишей» (реєстраційний номер 0112U004218, 2013-2017 р.р.).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є дослідження принципової можливості застосування відновлювального потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин для отримання терапевтичного ефекту в умовах важкого пошкодження органів.

Особистий внесок здобувача. Результати досліджень, викладені в дисертації, отримані автором самостійно, або за його безпосередньої участі. Автором проведено планування основних напрямків роботи, аналіз і обговорення результатів, підготовка публікацій за результатами досліджень. Роботи з тваринами та підготовка стовбурових клітин миші були проведені за допомогою співробітниць відділу генетики людини Л.І. Мацевич і Т.А. Рубан, стовбурові клітини з драглів Вартона пуповини людини виділялися та культивувалися спільно з співробітницею відділу регуляторних механізмів клітини Н.В. Шуваловою. Гістологічні препарати було виготовлено у співробітництві з кафедрою гістології та ембріології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця під керівництвом Ю.Б. Чайковського та за участю А.В. Корсак і А.В. Неверовського.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на конгресі World Conference on Regenerative Medicine 2015 Congress Center Leipzig, Germany, October 21-23 2015, а також на наукових семінарах відділу регуляторних механізмів клітини ІМБГ НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 праць, з яких 5 статей у наукових фахових журналах, тези 2 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій.

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

Одержані здобувачем результати є достовірними та об'єктивними. Дослідження проводилося на репрезентативному біологічному матеріалі – досліджено 400 лабораторних тварин у 16 серіях експериментів. Всі дослідження проводили з використанням атестованого і метрологічно перевіреного обладнання і реактивів якості «чда» і вище. Застосовані сучасні інформативні методи дослідження: фізіологічні, біохімічні та гістопатоморфологічні, які підтверджують стан еСПОД у модельних тварин.

Для оцінки даних малих вибірок був застосований критерій Бейлі, розроблений для дослідження малих вибірок, якщо повністю невідома структура генеральної сукупності. Для візуалізації діагностичних показників окремих груп експериментів застосовувався інструмент Dashboard. Для аналізу статистичної достовірності відмінності у кількості клітин між різними експериментальними групами в аналізах зростання культури використовували критерій Манна - Уїтні (при $p < 0,05$). Для аналізу морфометрії розраховували дисперсію та коефіцієнт варіації. Достовірність різниці по цих показниках визначали за допомогою критерію Манна-Уїтні (при p

<0,05). Статистичний аналіз даних виконували за стандартними формулами та за допомогою програми Microsoft Excel.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 103 найменувань. Дисертацію викладено на 134 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 44 рисунками і 7 таблицями.

До списку використаної літератури входять 103 джерела, 98 з яких англомовні.

У вступі висвітлено актуальність проблеми, визначено мету і завдання дослідження, наведено новизну та практичну значимість отриманих результатів, дані про апробацію роботи та результати впровадження.

Огляд літератури представляє собою логічний аналіз сучасного стану вивчення проблеми, з відображенням суперечливих та мало вивчених питань, що є обґрунтуванням вибору наукового напрямку дослідження. Огляд складається з 7 підрозділів, в кожному з яких, представлені сучасні дані щодо: характеристики хронічних патологічних станів, зокрема поліорганної недостатності, як наслідку системних порушень, надана характеристика відновлювального потенціалу МСК і можливих ризиків їх застосування. Ґрунтовно представлена модель системного ураження, з урахуванням особливостей впливу CCl_4 на організм та розглянуті механізми дії CCl_4 у клітині і можливості використання моделі CCl_4 для вивчення органних уражень. Недоліком даного розділу вважаю відсутність заключення зі стислим аналізом набутків і недоліків світових напрацювань в даному аспекті, що значно підвищило би розуміння рівню актуальності і перспективності розвитку наукового напрямку.

У розділі 2 надана характеристика використаного для дослідження біологічного матеріалу, хімічних агентів, матеріалу для культуральної роботи, лабораторним тваринам, обладнанню. Логічно та послідовно описані методи дослідження. Автором висвітлені особливості дизайну експериментів щодо напрямів досліджень в області використання терапевтичних МСК на тлі виснажених систем детоксикації: розглянуто вплив терапевтичної дози, спосіб трансплантації клітин, кількість процедур трансплантацій МСК, відмінності між алогенними і ксеногенними МСК, відмінності впливу МСК і кондиційованого середовища; відмінності у відповіді самців і самок, розвиток терапевтичних ефектів у тривалому часі. Цінним є те, що автор використав модифіковані оригінальні протоколи досліджень.

Для оцінки даних малих вибірок був застосований критерій Бейлі, розроблений для дослідження малих вибірок, якщо повністю невідома структура генеральної сукупності. Для візуалізації діагностичних показників окремих груп експериментів застосовувався інструмент Dashboard.

Для аналізу статистичної достовірності відмінності у кількості клітин між різними експериментальними групами в аналізах зростання культури використовували критерій Манна - Уїтні (при $p < 0,05$). Для аналізу морфометрії розраховували дисперсію та коефіцієнт варіації. Достовірність різниці по цих показниках визначали за допомогою критерію Манна-Уїтні (при $p < 0,05$). Статистичний аналіз даних виконували за стандартними формулами та за допомогою програми Microsoft Excel.

У розділі 3 представлені результати досліджень. Розділ складається з двох основних підрозділів, кожний з яких також розділено на підрозділи.

Підрозділ 3.1 присвячений розробці тваринної експериментальної моделі поліорганної дисфункції та її характеристиці і складається ще з 7 підрозділів.

Спираючись на випробувану в відділі модель фіброзу печінки у щурів із застосуванням токсичного ураження, опосередкованого CCl_4 , дисертантом були розроблені і перевірені початкові умови аналогічного ураження мишей для досягнення потрібної патології. Для пошуку оптимальної схеми отримання системного ураження дисертант досліджував широке коло доз CCl_4 , частот його введення і тривалості експерименту, а також ретельно було досліджено особливості патоморфологічних змін внутрішніх органів модельних тварин і охарактеризовані зміни деяких показників крові мишей із відтвореним еСПОД. Так, автор відмічає перевантаження імунної системи на основі порушень вмісту (АЛТ) і (АСТ / АЛТ) і підвищеного вмісту лейкоцитів, з превалюванням рівню неактивних (МТТ-тест). За допомогою ультразвукового дослідження автором було показано, що в результаті токсичної дії CCl_4 , крім дисфункції печінки відбувається звуження *vena portae hepatis*, що ускладнює відтік венозної крові від непарних органів і, в свою чергу, може ускладнювати стан інших органів. Морфологічна будова селезінки миші через 3 тижні самовідновлення після CCl_4 -ураження, атрофія білої пульпи і зменшення кількості клітин лімфоцитарного ряду у тварин контрольної групи самовідновлення після тривалого навантаження тетрахлоретаном, на думку автора, вказує на виснаження імунної системи і міграцію клітинних елементів в уражені органи (печінку, легені, нирку). У тварин залишених для самовідновлення після тривалого навантаження тетрахлорметаном тестується явне порушення нормальної гістоархітекtonіки альвеол і присутність альтеративних-

деструктивних змін в легенях. На основі патологічно-морфологічного опису дисертант підтверджує серйозні ураження більшості органів і систем життєзабезпечення. Найбільші зміни стосуються печінки, легенів і підшлункової залози. На основі отриманих результатів створено та охарактеризовано тварину модель експериментального синдрому поліорганної дисфункції шляхом систематичного введення мишам лінії ICR CCl_4 . Автором запропонована оптимальна схема отримання системного ураження і алгоритм лабораторного супроводу експерименту на основі дослідження фізіологічних, біохімічних та гістопатоморфологічних характеристик, які підтверджують стан еСПОД у модельних тварин.

В підрозділі 3.2. наведені результати дослідження терапевтичного потенціалу МСК на тлі відтвореного еСПОД у мишей. Підрозділ складається з 4 частин.

Для з'ясування можливості реалізації терапевтичного потенціалу трансплантованих МСК за умов еСПОД при виснажених системах детоксикації було поставлено ряд експериментів із застосуванням МСК різного походження, доз і терміну тривалості післядії. Автором доведено, що за критерієм виживаності в експериментальних групах в порівнянні з групою самовідновлення спостерігався позитивний результат, що було підтверджено відновленням або позитивними тенденціями до відновлення показників крові і патоморфологічного стану печінки, селезінки, легенів, нирки.

В результаті дослідження можливості впливу трансплантованих МСК на реалізацію схильності до пухлиноутворення у генетично-детермінованих до канцерогенезу модельних тварин на основі суб'єктивної інтегральної оцінки встановлено, що у самців дослідних тварин (миші ICR лінії) у самців яких «в нормі» схильність до канцерогенезу не реалізується, в результаті хронічного ураження CCl_4 у 22% з'являлись новоутворення. За умов трансплантації алогенних МСК цей показник не мав вірогідних відмінностей при порівнянні з групою контролю. При трансплантації ксеногенних МСК новоутворення виявлені лише у 9% з достовірністю 0,95, в зв'язку з чим дисертант робить висновок про залежність даного ефекту від ступеню спорідненості МСК. Автором доведено, що трансплантовані МСК, в умовах системного ураження організму, не підсилюють і не прискорюють розвиток пухлин у тварин з наявною спадковою схильністю до канцерогенезу.

За результатами досліджень МСК людини були активніші за МСК миші. Ксеногенні МСК викликали більш виражену запальну реакцію, хоча це і не впливало на індекс загальної виживаності.

Вперше показано, що МСК не втрачають свого відновлювального потенціалу за умов оксидативного стресу і виснаження механізмів детоксикації клітин, що був викликаний тривалим навантаженням CCl_4 . Гістологічна картина змін свідчить про позитивні тенденції до відновлення. Автором доведено залежність терапевтичного ефекту трансплантованих МСК від дози введених клітин. Отримані дані свідчать про наявність порогового ефекту для підвищення рівня виживаності. Інтегральна за всіма експериментами оцінка довгострокового ефекту (6-9 тижнів) після трансплантації стовбурових клітин показала, що руйнування клітин печінки і кардіоміоцитів, в більшості випадків припинялося, а корельоване підвищенням активності клітин імунної системи зі зниженням рівня АЛТ в крові свідчить про активацію процесів відновлення компонентів імунопоезу.

Отримані результати свідчать про потенціальну ефективність застосування трансплантації МСК за умов важкого системного ураження організму, а запропонований автором алгоритм лабораторного дослідження в перед- та після трансплантаційному періодах можуть скласти основу для подальшої розробки протоколів лабораторного супроводу при зазначених станах.

Розділ 4 присвячений аналізу та узагальненню отриманих результатів – 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 можливих механізмів терапевтичного впливу МСК та кондеціонованого МСК середовища на моделях експериментального хронічного токсичного ураження із синдромом поліорганної дисфункції.

Проведений аналіз також свідчить про перспективність подальшої розробки даного наукового напрямку як з позицій фундаментальної науки так і з позицій прикладної біології і медицини

Автореферат повністю відповідає матеріалам, викладеним в дисертаційній роботі, а у висновках, повністю відображені усі наукові положення дисертації.

Відносно оформлення дисертаційної роботи слід зазначити, що вона викладена хорошою академічною українською мовою. Рукопис містить достатню кількість ілюстративного матеріалу, що полегшує сприйняття роботи. Разом з тим слід відмітити не зовсім коректно поставлені завдання роботи, оскільки не конкретизовано за якими параметрами буде оцінюватись «... наявність терапевтичного ефекту у модельних тварин із еСПОД під впливом

трансплантації МСК» і «... особливості дії різних за походженням МСК в умовах еСПОД». Таке формулювання завдань позначається і на ступені конкретизації висновків. Не зовсім вдало сформульовано 6 висновок, оскільки саме « трансплантовані МСК за умов важкого системного ураження організму» не можуть бути використані для детальної розробки протоколів терапевтичного застосування .

Існує певна кількість неточностей і помилок в тексті, але вони не заважають загальному сприйняттю матеріалу і 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.

У процесі рецензування виникли деякі дискусійні питання:

1. Питання:

У висновку 2 Ви наголошуєте, що значний вплив на якість терапевтичного ефекту визначає якість самих МСК, яка може відрізнитись попри стандартизовану методику їх отримання, що підтверджує необхідність стандартизації терапевтичних МСК за функціональними критеріями. Чи сформовано на сьогодні в світовій практиці спектр критеріїв оцінки функціональних характеристик МСК для паспортизації якості клітин.

2. Питання:

Вами показано, що трансплантовані алогенні МСК, в умовах активації реалізації спадкової схильності до канцерогенезу, яка викликана токсичним системним ураженням, додатково не активують і не прискорюють розвиток пухлин, оскільки відсоток реалізованих новоутворень в групах спостереження майже не різнився. Разом з тим, застосування ксеногенних МСК вірогідно знижувало відсоток реалізації новоутворень, що свідчить про певний протективний ефект. Як теоретично можна пояснити даний біологічний ефект?

Заключення

Дисертаційна робота Іродова Д.М. «Дослідження терапевтичного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин в умовах синдрому полі органної дисфункції на тлі тривалого токсичного ураження організму», представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, є закінченою науковою працею, за актуальністю і новизною, науковою концепцією і методичними підходами виконання характеризується як високопрофесійна робота, яка має перспективи розвитку. Робота відповідає

обраної спеціальності і вимогам п.п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів» затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015р., № 1159 від 30.12.2015 р., № 576 від 27.07.2016 р., № 943 від 20.11.2019 р. № 607 від 15.07.2020 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а сам дисертант заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент

завідувач лабораторії імуногенетики

відділу гематології та трансплантології

ДУ «Національний науковий центр

радіаційної медицини НАМН України»

доктор біологічних наук, професор

Ж.М. Мінченко

