

## **ВІДГУК**

### **офіційного опонента**

професора, завідувача відділу загальної та молекулярної патофізіології  
Інституту фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України

**ДОСЕНКА Віктора Євгеновича**

на дисертаційну роботу

**КИРИКА Віталія Михайловича**

«Патогенетичні механізми реалізації регенеративного потенціалу соматичних  
стовбурових клітин з урахуванням критеріїв їх якості та ефективності»  
за спеціальністю 14.03.04 "Патологічна фізіологія" (222 – Медицина) у галузі  
22 – Охорона здоров'я, представлена до спеціалізованої вченої ради  
Буковинського державного медичного університету Д 76.600.02  
на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

### **Актуальність теми дисертації та зв'язок з науковими програмами.**

Безсумнівно, що вивчення стовбурових клітин є надзвичайно актуальним. Виходячи з того, що стовбурові клітини мають здатність диференціюватись у різні типи тканин організму, відкривається безліч можливостей для застосування стовбурових клітин в регенеративній медицині. А якщо йдеться про клінічне застосування, то, звісно, виникає питання контролю якості, уніфікації препаратів стовбурових клітин – лише за виконання цієї умови можливе досягнення прогнозованої та уніфікованої ефективності. Саме цій проблемі і присвячена дисертаційна робота.

Виконання дисертаційного дослідження Віталія Кирика було пов'язано з роботою над декількома науковими та науково-практичними темами. Дослідження проведені в рамках виконання планових науково-дослідних робіт ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України": "Дослідити на моделях тривимірного культивування потенціал до направленого диференціювання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин різного походження" (№ держреєстрації 0113U000101), "Встановлення регенеративного потенціалу ендотеліальних клітин-

попередників при пошкодженні тканин ішемічного генезу" (№ держреєстрації 0116U000140), "Встановлення регенеративного потенціалу стовбурових клітин міокарда на моделях пошкодження серця у мишей" (№ держреєстрації 0119U000086). Додаткові результати також отримано при виконанні науково-дослідної роботи "Встановлення морфофункціональних властивостей мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини в оваріоектомованих мишей різного віку" (№ держреєстрації 0118U100249); проєкту GP/F44/057 "Характеристика субпопуляцій мультипотентних клітин плаценти для потреб регенеративної медицини" по гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених; проєктів № 5977 "Effect of stem cells transplantatio on the nervous tissue regeneration in perinatal CNS pathology" та № 6262 "Development of technology for three-dimensional culture of multipotent cells to regenerate tissue after ischemic injury" по грантах Українського науково-технологічного центру; проєкту №55952 "Розробка критеріїв біобезпеки стовбурових клітин жирової тканини" по гранту Президента України докторам наук для здійснення наукових досліджень. Результати дисертації також увійшли до роботи "Новітні методи застосування стовбурових клітин і біоінженерних технологій у регенеративній медицині", удостоєної у 2021 р. першої Національної премії України ім. Бориса Патона.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність.** Здобувач точно і чітко сформулював мету і відповідні завдання дослідження, які полягали у встановленні ключових критеріїв якості та відповідності соматичних стовбурових клітин з жирової тканини, плаценти, серця та судин за характеристиками культур *in vitro*; загальних доклінічних критеріїв ефективності соматичних стовбурових клітин при трансплантації на моделях пошкодження тканин *in vivo*; морфологічних, фенотипічних та функціональних характеристик ММСК жирової тканини та ін. Робота виконана протягом тривалого часу, тому містить великий обсяг результатів експериментальних та клінічних досліджень. Поставлені завдання роботи реалізовані в повному обсязі

з використанням відповідних сучасних методів досліджень. На підставі аналізу отриманих результатів досліджень із застосуванням статистичних методів були сформульовані обґрунтовані висновки та наукові положення. У тексті дисертації відсутнє порушення вимог академічної доброчесності.

Необхідний для належної статистичної обробки масив даних було отримано на експериментальному матеріалі з використанням достатньої кількості первинних культур клітин від лабораторних мишей ліній FVB "дикого типу", CBA/Ca та трансгенних FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, а також у групах порівняння тварин із змодельованим пошкодженням кісток, критичною ішемією кінцівок та кардіоміопатією. Автор ретельно дотримувався норм біоетики при роботі з піддослідними тваринами та моделюванні пошкоджень, що засвідчено висновком Комісії з питань біоетики ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска НАМН України". Використані у дослідженні сучасне обладнання та реактиви відповідають належним метрологічним параметрам і сертифікатам відповідності виробників, що гарантує якість та достовірність отриманих результатів. Клінічний фрагмент роботи проведено в рамках пілотного клінічного випробування з оцінки безпеки інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти, до якого на початковому етапі було залучено 8 пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією та важкою серцевою недостатністю. Дисертант наводить чіткі критерії включення та не включення учасників у дослідження, а також перелік діагностичних інструментальних параметрів, які оцінювали в динаміці лікування, а тому достовірність отриманих результатів також не викликає сумнівів.

**Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.** В дисертаційній роботі Віталія Михайловича Кирика вперше визначено фізіологічні особливості реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин різного походження із врахуванням критеріїв якості та доклінічної ефективності при пошкодженні кісткової, м'язової тканини та серцево-судинної системи. Вперше встановлено, що забезпечення

якості соматичних стовбурових клітин різного походження потребує врахування відповідності їхніх морфофункціональних та імунофенотипічних характеристик, потенціалу спрямованого диференціювання, проліферативної та клоногенної активності, життєздатності клітин залежно від їх типу, походження, віку донора, технології виділення, просторових умов та тривалості культивування *in vitro*. Врахування вікових аспектів дозволило дисертанту встановити відмінності клітин-попередників з різних відділів міокарда миші та людини в динаміці за експресією специфічних маркерів, а потім інтраміокардіально застосувати ММСК плаценти у пацієнтів із ішемічною хворобою серця.

Вперше продемонстровано особливості контактної міжклітинної взаємодії та можливість спрямованого диференціювання ММСК жирової тканини в умовах тривимірних культур мікрмаси та гідрогелів на основі карбомеру 974Р. Для досліджуваних об'ємних культур встановлено здатність покращувати показники регенерації кісткової тканини та ішемізованих м'язів.

Важливим моментом стало встановлення ролі змодельованої дисфункції ніші стовбурових клітин у порушенні їхніх морфофункціональних властивостей, що є вагомим аргументом щодо певної настороженості при виборі донора клітинного матеріалу із врахуванням вікових аспектів та супутньої патології.

Автором вперше продемонстровано вагоме значення ростових факторів (EGF, bFGF, кардіотрофін та ін.) і субстратів росту (таких як фібронектин, Matrigel, полі-Д-лізин) у належному диференціюванні типоспецифічних прогеніторів з міокарда та судин, що було підтверджено за експресією імунофенотипічних маркерів та скоротливою активністю.

**Практичне значення дисертаційної роботи.** За результатами досліджень було розроблено технології тривимірного культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини, ендотеліальних прогеніторів та клітин-попередників з міокарда. Розроблено протоколи мультипараметричного імунофенотипування методом лазерної

проточної цитометрії різних типів соматичних стовбурових клітин. Результати дисертаційної роботи впроваджені в практичну діяльність наукових підрозділів Інституту генетичної та регенеративної медицини ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска Національної академії медичних наук України", ДУ "Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова Національної академії медичних наук України". На основі результатів доклінічних досліджень на базі Національного інституту серцево-судинної хірургії імені М. М. Амосова Національної академії медичних наук України проведено першу фазу пілотного клінічного випробування з інтраміокардіального застосування мультипотентних стовбурових клітин плаценти "Оцінка ефективності застосування стовбурових клітин міокарда, кісткового мозку, плаценти, жирової тканини та їх комбінацій у лікуванні хворих на ішемічну кардіоміопатію" за дозволом Координаційного центру трансплантації органів, тканин і клітин Міністерства охорони здоров'я України, що свідчить про впровадження результатів в клінічну практику охорони здоров'я. Практичний внесок дисертації також підтверджений 5 патентами на корисну модель, 2 технологіями та 6 нововведеннями.

Висвітлені у дисертації положення щодо якості клітинних трансплантатів були використані здобувачем під час участі у робочих групах МОЗ України з розроблення "Ліцензійних умов провадження господарської діяльності банків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини", затверджених Постановою Кабінету Міністрів України № 286 від 2 березня 2016 р., та з питань положень Закону України "Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині" № 2427-VIII від 17 травня 2018 р.

**Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.** Основні положення дисертації висвітлено у 55 наукових працях, серед них 31 стаття у періодичних наукових виданнях і 2 статті у збірниках, зокрема 10 статей опубліковано в журналах першого та другого квартилу. З опублікованих за темою дисертації робіт 20 – у фахових виданнях МОН

України, 18 індексуються у наукометричній базі Scopus та 10 – у базі Web of Science. За матеріалами досліджень зроблено 13 усних та 2 стендових доповіді, опубліковано 16 тез у збірниках всеукраїнських та міжнародних конференцій, що свідчить про повне висвітлення результатів роботи серед широкого кола науковців в Україні та за її межами.

**Відсутність порушення академічної доброчесності.** У дисертаційній роботі не виявлено порушень академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів, що зустрічаються в тексті дисертації, мають посилання на відповідне джерело. Відсутність плагіату та оригінальність матеріалів дисертаційної роботи підтверджені Комісією по запобіганню та виявленню плагіату ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска Національної академії медичних наук України" (експертний висновок від 5 жовтня 2023 р.). Наявність усіх первинних даних вимірювань за час виконання дисертаційної роботи підтверджена експертною комісією ДУ "Національний науковий центр "Інститут кардіології, клінічної та регенеративної медицини імені академіка М. Д. Стражеска Національної академії медичних наук України" (акт перевірки первинної документації від 14 липня 2023 р.).

**Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.** Дисертація Кирика Віталія Михайловича оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Повний обсяг роботи викладений на 400 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, розділів результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та додатків.

Анотація українською та англійською мовами за своїм обсягом та повнотою викладення основних положень дисертації повністю відповідає належним вимогам, ключові слова чітко вказують на профіль дослідження.

Здобувачем було детально проаналізовано достатньо велику кількість закордонних публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дослідження. Розділ **Огляд літератури** чітко структурований, охоплює висвітлення проблеми та опис найактуальніших проблем регенеративної медицини із застосування стовбурових клітин. **Методи дослідження** включають імунофенотипування клітин методом проточної цитометрії, імуноцитохімічне дослідження клітин, електронно-мікроскопічне дослідження ММСК, гістологічні дослідження, лазерна доплерівська флоуметрія та, навіть, електрокардіографія в мишей. **Результати власних досліджень** містять 4 розділи, в яких детально і чітко викладені отримані дані та повністю розкрито суть дослідження з належним підтвердженням у числовому і графічному вигляді. Роботу ілюструють 120 кольорових рисунків (мікрофотографії цитологічних та гістологічних мікропрепаратів, гістограми мультипараметричного імунофенотипування клітин методом лазерної проточної цитометрії, копії електрокардіограм та даних лазерної доплерівської флоуметрії, стовпчикові та блокові порівняльні гістограми, запропоновані автором схеми механізмів реалізації регенеративного потенціалу стовбурових клітин), а також 11 таблиць з порівнянням різних досліджуваних показників в експериментальних групах. Після кожного розділу автор зазначає посилання на публікації, в яких висвітлено основні положення відповідної частини роботи.

В розділі **Аналіз та обговорення результатів** здобувач логічно та критично проводить аналіз отриманих результатів досліджень, спираючись та порівнюючи власні наукові знахідки, та результати інших груп дослідників, завдяки чому логічно обґрунтовано виводить читача на **висновки** дисертаційної роботи. На початку висновків дисертант наводить системне узагальнення отриманих результатів щодо встановлення механізмів реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин за умов дотримання належних критеріїв їх якості. Усі 10 висновків цілком відповідають поставленим на початку роботи завданням та містять повне необхідне обґрунтування основних положень дисертаційного дослідження.

Список цитованої літератури включає 416 посилань, оформлених за вимогами Додатку 3 наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 р. "Про затвердження Вимог до оформлення дисертації". У додатках наведено перелік публікацій за темою дослідження із ретельним зазначенням особистого внеску автора у кожну публікацію у співавторстві; відомості про апробацію результатів на конференціях; акти впровадженнь та перелік використаних у дослідженні моноклональних антитіл для імунофенотипування стовбурових клітин різних типів.

Загалом, позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Кирика Віталія Михайловича, все ж, виникають деякі зауваження та уточнюючі запитання:

1. Патологічна фізіологія, безумовно, дуже широка наукова спеціальність, але за будь-якого застосування має надавати відповідь на питання про етіологію, патогенез захворювання. З огляду на це твердження, чи вдалося автору отримати нову інформацію про причини та механізми розвитку патологічних процесів в своїй роботі?

2. Незаперечно, що патофізіологи шукають і нові, патогенетично обґрунтовані, методи експериментальної терапії різних захворювань, що повної мірою продемонстровано автором роботи, але чи набудуть вони широкого застосування, з огляду не лише на вартість самого матеріалу, а ще й враховуючи складність оцінки його якості, на якій наполягає здобувач?

3. Якість окремих гістологічних препаратів невігідно контрастує на тлі високого методичного та виконавчого рівня інших досліджень.

4. Так само застосовані автором функціональні методи оцінки функції серця мишей не є найбільш сучасними – частота серцевих скорочень, ширина інтервалу QRS та інші ЕКГ параметри не можуть вважатися надійними показниками ефективності будь-якого терапевтичного впливу.

5. Недостатню увагу приділено методам детекції трансплантованих клітин в тканинах та органах експериментальних тварин: чи залишаються вони там, чи виконують функцію, який відсоток пересаджених (маркованих певним чином) клітин визначається в органі через місяць, рік?



Проте, запитання та зауваження, які виникли під час ознайомлення з роботою Кирика Віталія Михайловича, мають суто дискусійне значення і жодним чином не впливають на високу оцінку дисертації в цілому.

**ВИСНОВОК.** Дисертаційна робота Кирика Віталія Михайловича «Патогенетичні механізми реалізації регенеративного потенціалу соматичних стовбурових клітин з урахуванням критеріїв їх якості та ефективності», представлена на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук, є завершеною науковою працею, яка за актуальністю теми, новизною постановки проблеми та обсягом досліджень, теоретичними і практичними значеннями отриманих результатів, а також сучасним методичним рівнем проведених досліджень, свідчить про виняткові наукові досягнення здобувача. Базуючись на вищевказаному, вважаю, що дисертаційна робота Кирика В. М. повністю відповідає вимогам пп. 7-9 "Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 р., а здобувач, Кирик Віталій Михайлович, заслуговує на присудження ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 "Патологічна фізіологія" (222 – Медицина) у галузі 22 – Охорона здоров'я.

### **Офіційний опонент**

доктор медичних наук, професор,

завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології

Інституту фізіології імені О. О. Богомольця

Національної академії наук України

**Віктор ДОСЕНКО**



*Віктор Досенко*  
*[Handwritten signature]*