

С оценок ознакомлена  
21.05.26 Др. Е.А. Бриссарова

### Отзыв официального оппонента

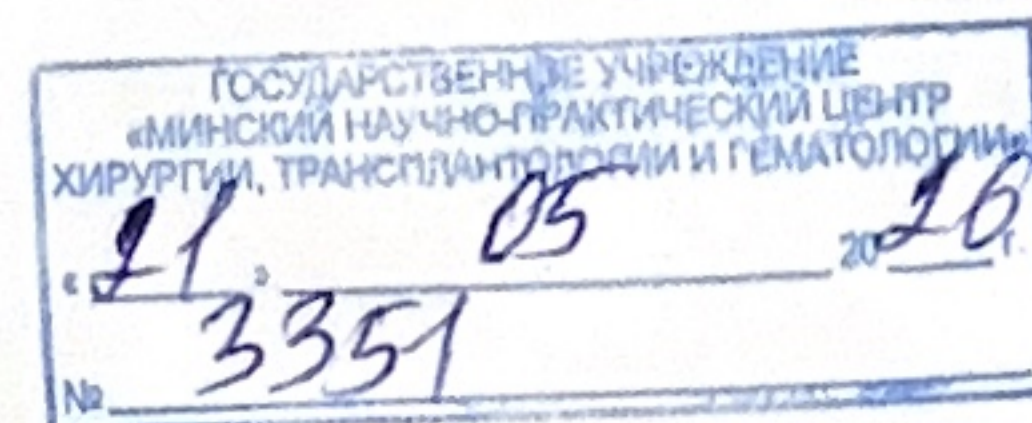
кандидата биологических наук, доцента Белевцева Михаила Владимировича на диссертационную работу Примаковой Евгении Алексеевны «Обоснование выбора мезенхимальных стволовых клеток для применения при острой реакции «трансплантат против хозяина» на основе оценки их иммунобиологических характеристик», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

**Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите**

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

В диссертационном исследовании Примаковой Е.А. определены прогностические критерии развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (ОРТПХ) после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК), а также их диагностическая значимость, что соответствует п. 8 паспорта специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы (п. 8. Изучение этиологии, патогенеза, профилактики и коррекции патологических реакций, связанных с биологической несовместимостью органов и тканей реципиента при внедрении в него чужеродных клеток и тканевых структур). Установлены дополнительные критерии диагностики ОРТПХ в посттрансплантационном периоде (концентрация ИЛ-8 и ИЛ-21 в плазме крови), что соответствует п. 14 паспорта специальности (п. 14. Профилактика, прогнозирование и лечение реакции отторжения донорских органов и тканей). Научно обоснован подход к выбору БМКП на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани, учитывающий их иммуномодулирующие свойства и функциональные особенности лимфоцитов пациентов и позволяющий персонифицировать клеточную терапию ОРТПХ, что соответствует п. 9 паспорта специальности (п. 9. Разработка, испытание и практическое применение лекарственных средств, физико-химических и биологических факторов и различного рода воздействий, направленных на подавление реакции отторжения чужеродного органа, части органа, тканей или клеток человека, или животных в экспериментальных и клинических условиях).

По содержанию выполненных исследований, полученных результатов, сформулированных положений диссертационная работа относится к отрасли «биологические науки», так как содержит фундаментально ориентированные исследования на клеточном материале (МСК и лимфоциты) и биологических жидкостях человека (плазма крови) *in vitro* и экспериментально обосновывает применение трансплантационных технологий с использованием МСК в клинике.



### **Актуальность темы диссертации**

Острая реакция «трансплантат против хозяина», особенно ее резистентная форма, остается основной причиной смерти реципиентов после аллоТГСК. Одним из основных ограничений в исследовании и терапии оРТПХ является то, что зачастую диагноз и прогноз почти полностью зависят от наличия клинических симптомов. В настоящее время не существует валидированных лабораторных тестов для прогнозирования риска развития оРТПХ. Кроме того, несмотря на широкое применение клеточной терапии с использованием МСК при оРТПХ, эффект, получаемый от комплексной терапии, не всегда можно спрогнозировать, поскольку выделенные из ткани взрослого человека МСК гетерогенны, а условия культивирования и клеточное микроокружение могут влиять на функциональную активность и свойства данных клеток. Решение этих актуальных задач предложено соискателем в диссертационном исследовании и не только углубляет понимание механизмов иммуномодулирующего действия МСК, но и, благодаря предложенному методу подбора, позволяет оптимизировать использование клеточной терапии при данном иммунопатологическом состоянии.

В связи с этим, тема диссертационного исследования Примаковой Е.А. является, безусловно, актуальной и соответствует приоритетным направлениям научной деятельности Республики Беларусь в части клеточных и медицинских биотехнологий.

### **Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту**

При реализации задач диссертационного исследования получен ряд новых научных результатов, среди которых можно выделить следующие:

1. определена диагностическая значимость количественной оценки пролиферативной активности лимфоцитов донора и реципиента аллоТГСК в смешанной культуре *in vitro* и установлены пороговые значения индекса стимуляции (ИС) как прогностического фактора риска оРТПХ в посттрансплантационном периоде (ИС донора выше 9,20; ИС донор/реципиент выше 11,55). Показано, что концентрация ИЛ-8 более 5,56 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в плазме крови пациентов после аллоТГСК является дополнительным критерием диагностики оРТПХ;

2. доказано, что взаимодействие между МСК и лимфоцитами периферической крови обеспечивает высвобождение растворимой иммунорегуляторной молекулы HLA-G и не влияет на продукцию молекулы Gal-1;

3. предложена *in vitro* модель культивирования лимфоцитов пациентов с оРТПХ одновременно на подложках из нескольких культур МСК с последующей оценкой динамики субпопуляционного состава лимфоцитов;

4. научно обоснован подход к выбору БМКП на основе МСК, учитывающий их иммуномодулирующие свойства и функциональные особенности лимфоцитов пациентов, и позволяющий персонифицировать и

оптимизировать клеточную терапию оРТПХ, продемонстрирована его эффективность (клинический ответ в 83% случаев).

### **Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Достоверность и обоснованность представленных в диссертационной работе результатов и выводов не вызывает сомнения, так как они получены с использованием современных методов исследования (культуральный метод, иммуноферментный анализ, проточная цитометрия, мультиплексный анализ).

В диссертации выполнено корректное сравнение полученных результатов с результатами, представленными в литературных источниках.

Исследование проведено на репрезентативных выборках клеточных культур МСК ( $n = 39$ ), лимфоцитов пациентов ( $n = 42$ ) и их ко-культур ( $n = 71$ ), а также супернатантов клеточных культур ( $n = 78$ ), образцов плазмы пациентов после аллоТГСК ( $n = 63$ ) и здоровых доноров ( $n = 9$ ). Реципиентами МСК являлись пациенты с оРТПХ ( $n = 12$ ). Для анализа полученных данных использовались современные методы статистической обработки, рекомендуемые для медико-биологических исследований (критерий Шапиро-Уилка, тест Манна-Уитни, критерий Вилкоксона, корреляция по Спирмену, ROC-анализ).

Положения и выводы, изложенные в диссертации, соответствуют поставленным цели и задачам, обоснованы и аргументированы. Заключение, сделанные на основании полученных данных, являются логичными, достоверными и способствуют углублению научных знаний в данной области.

Рекомендации по практическому использованию логично вытекают из полученных экспериментальных результатов и могут быть использованы для оптимизации клеточной терапии оРТПХ.

### **Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию**

#### *Научная значимость результатов диссертации*

При проведении диссертационного исследования автором получены важные фундаментальные и прикладные данные, научную значимость которых определяет то, что:

- экспериментально обосновано использование метода количественной оценки пролиферативной активности лимфоцитов донора и реципиента аллоТГСК в смешанной культуре *in vitro* для прогнозирования риска развития оРТПХ, установлены пороговые значения индекса стимуляции донора (более 9,20) и донора/реципиента (более 11,55), которые определяют риск развития оРТПХ;

- определены дополнительные лабораторные критерии оРТПХ (концентрация ИЛ-8  $>5,56$  пг/мл и ИЛ-21  $>0,218$  пг/мл в плазме крови).

Показано, что оРТПХ сопровождается увеличением концентрации ИЛ-8 и ИЛ-21 в плазме крови реципиентов аллоГСК;

- показано, что взаимодействие между МСК и лимфоцитами периферической крови при их совместном культивировании обеспечивает достоверное увеличение продукции sHLA-G и не оказывает влияния на содержание иммунорегуляторной молекулы Gal-1 *in vitro* по сравнению с интактными лимфоцитами;

- установлено, что индивидуальные иммунобиологические особенности лимфоцитов пациентов с оРТПХ и донорских МСК определяют направленность иммуномодулирующего действия последних, проявляющуюся перераспределением субпопуляций иммунокомпетентных клеток пациентов (Т-лимфоцитов, NK-клеток, Т-регуляторных клеток в популяции CD4<sup>+</sup>-клеток) при их совместном культивировании *in vitro*;

*Практическая значимость* заключается в разработке метода выбора МСК, основанного на предварительной *in vitro* оценке влияния МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов с оРТПХ с последующей оценкой изменений относительного содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными лимфоцитами, применение которого позволяет достигнуть полного или частичного клинического ответа на клеточную терапию в 83% случаев.

Практическая значимость также подтверждается внедрением результатов исследования в образовательный процесс и практическую работу ГУ «МНПЦ ХТиГ» (2 акта внедрения). Утверждена инструкция по применению «Методы медицинской профилактики и терапии реакции «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» от 23.12.2022 г. рег. № 142-1222.

*Социальная и экономическая значимость* результатов диссертационного исследования заключается в оптимизации использования биомедицинских клеточных продуктов и возможности улучшения качества оказания медицинской помощи пациентам с оРТПХ с применением персонализированного подхода.

### **Опубликованность результатов диссертации в научной печати**

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 1 статья в иных рецензируемых научных журналах, 7 тезисов докладов в сборниках научных работ, материалов конференций, съездов, конгрессов, из них 5 – в зарубежной печати, 1 инструкция по применению. Общий объем опубликованных материалов – 4,62 авторских листа.

Материалы опубликованных работ соответствуют теме диссертации и основным положениям, выносимым на защиту. Анализ представленных

данных позволяет сделать заключение о достаточной опубликованности результатов диссертации.

### **Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК**

Диссертация Примаковой Евгении Алексеевны «Обоснование выбора мезенхимальных стволовых клеток для применения при острой реакции «трансплантат против хозяина» на основе оценки их иммунобиологических характеристик» и ее автореферат оформлены в соответствии с требованиями ВАК Республики Беларусь и полностью отражают содержание представленной работы, ее основные положения, выносимые на защиту, полученные результаты, сделанные на их основании заключения, выводы и практические рекомендации.

Диссертация и автореферат написаны ясным научным языком, результаты исследований изложены последовательно и логично, выводы обоснованы и корректны. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и выносимых на защиту положений.

В ходе ознакомления с диссертационной работой возникли следующие вопросы:

1. При оценке цитокинового профиля плазмы крови пациентов с острым РТПХ наряду с повышением концентрации ФНО-альфа и ИЛ-8, выявляется снижение концентрации ИЛ-17А, ИНФ-гамма и TGF- $\beta$ . Поясните пожалуйста, каким образом применение МСК повлияет на иммунный ответ связанный с регуляцией уровня ИЛ-17А, являющегося ключевым цитокином активации противогрибкового и антибактериального иммунитета.
2. Проводили ли вы сравнение тактики лечения пациентов с острым РТПХ с применением и без применения МСК, и какой процент полного и частичного клинического ответа у пациентов с острым РТПХ без персонифицированного применения МСК?

Указанные замечания носят уточняющий характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

### **Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует**

Содержание диссертации, качество изложения научного материала, анализ полученных результатов и сделанные на их основе выводы и предложения по практическому использованию позволяют сделать вывод о том, что диссертация Примаковой Евгении Алексеевны «Обоснование выбора мезенхимальных стволовых клеток для применения при острой реакции «трансплантат против хозяина» на основе оценки их иммунобиологических характеристик» является законченной, самостоятельно выполненной квалификационной работой. Достоверность полученных результатов подтверждается публикациями в рейтинговых научных изданиях, представлением на научных форумах. Все это свидетельствует о том, что

Примакова Евгения Алексеевна является сложившимся, высококвалифицированным специалистом в области клеточных биотехнологий и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы.

### Заключение

Диссертация Примаковой Евгении Алексеевны «Обоснование выбора мезенхимальных стволовых клеток для применения при острой реакции «трансплантат против хозяина» на основе оценки их иммунобиологических характеристик», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы, является завершённым квалификационным научным исследованием, проведённым на высоком теоретическом и методическом уровне.

Диссертация полностью соответствует требованиям п.п. 20, 21 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», утвержденного Указом Президента Республики Беларусь от 17.11.2004 г. № 560 в редакции от 02.06.2022 г., предъявляемых к кандидатским диссертациям, так как содержит новые экспериментальные результаты по актуальному направлению научных исследований.

Автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы за:

- определение и установление диагностической значимости лабораторных критериев прогноза (индекс стимуляции лимфоцитов донора выше 9,20, а также лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре выше 11,55 в день трансплантации ГСК) и диагностики оРТПХ (концентрация ИЛ-8 более 5,56 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в плазме крови) после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток;

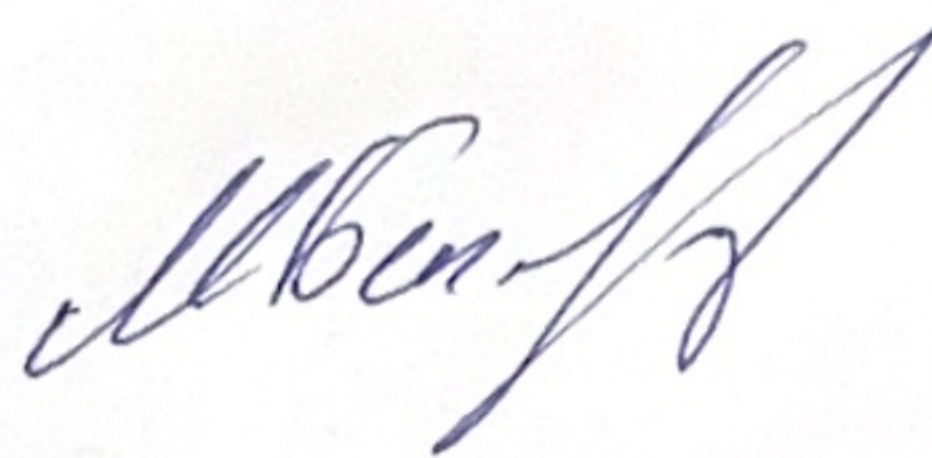
- оценку влияния взаимодействия лимфоцитов пациентов с оРТПХ и МСК на высвобождение растворимых иммунорегуляторных молекул sHLA-G и Gal-1 *in vitro*;

- выявление закономерностей в направленности и степени иммуномодулирующего действия МСК *in vitro* при совместном культивировании с лимфоцитами пациентов с оРТПХ в зависимости от индивидуальных иммунобиологических особенностей как лимфоцитов пациентов, так и донорских МСК;

- экспериментальное обоснование выбора МСК при оРТПХ, включающее разработку метода *in vitro* оценки влияния МСК на субпопуляционный состав лимфоцитов пациентов с оРТПХ (CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-лимфоцитов на подложке из МСК по сравнению с интактными лимфоцитами), позволяющего достигнуть полного или

частичного клинического ответа на клеточную терапию более чем в 80% случаев.

Официальный оппонент:  
зам. директора по науке  
ГУ «РНПЦ детской онкологии,  
гематологии и иммунологии»,  
кандидат биологических наук, доцент



М.В. Белевцев

«20» 05 2026 г.

ВЕРНО  
Специалист по кадрам  
Т.Е.М. Потоцкая Е.Р.  
«20» мая 2026

