

эффективности применения материала с целью трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Несмотря на проводимые исследования, единая точка зрения относительно роли материнских данных и неонатальных параметров в определении количественных характеристик пуповинной крови отсутствует. Эта неопределенность обуславливает научную и практическую значимость разработки достоверных прогностических предикторов. Поэтому установление надежных прогностических критериев для отбора образцов согласно международным стандартам является актуальной задачей, выполнение которой может являться рекомендацией для дальнейшего создания публичного банка пуповинной крови в Республике Беларусь.

Вторая часть исследования представляет комплексный анализ материала плаценты как перспективного источника МСК. В области использования плацентарных МСК сохраняется значительная неопределенность. Отсутствует стандартизированная методология выделения клеток и создания биомедицинского клеточного продукта. Результаты исследований о том, какая часть плаценты (материнская или плодная) является наиболее перспективной в зависимости от пролиферативной и иммуносупрессивной активности МСК, противоречивы. Изучение свойств мезенхимальных стволовых клеток актуально для обоснования создания криобанка МСК плаценты с целью последующей экспансии клеток при изготовлении биомедицинского клеточного продукта. Важным результатом диссертационного исследования является первая в Республике Беларусь оценка эффективности применения биомедицинского клеточного продукта на основе МСК плаценты в составе комбинированной иммуносупрессивной терапии у детей с острой реакцией «трансплантат против хозяина», что напрямую способствует повышению эффективности лечения этой категории пациентов.

Таким образом, тема диссертационной работы Лях Елены Геннадьевны «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения», её цель и задачи представляют несомненный научный и практический интерес.

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

Все научные положения, выносимые на защиту, и результаты, полученные в диссертации, обладают высокой степенью новизны.

В диссертационном исследовании автор выполнил многофакторный анализ и установил, что прогностическим критерием, наиболее значимо влияющим на получение образца пуповинной крови, удовлетворяющего международному стандарту NetCord-FACT, является объем нативной

пуповинной крови 40 мл и более. Показателями, имеющими прогностическую ценность, также являются вес новорожденного 3500 г и более и первые роды.

Автором показано, что содержание колониеобразующих единиц фибробластов в децидуальной ткани и хорионе плаценты, а также способность МСК из этих тканей к самовоспроизведению в культуре сопоставимы и статистически значимо выше, чем аналогичные показатели клеток амниона. Высокая пролиферативная активность МСК плаценты сохраняется в течение 9 пассажей после замораживания и криохранения.

В работе Елены Геннадьевны Лях доказано, что депонированные при криогенной температуре (-196 °С) МСК, выделенные из хориона, амниотической оболочки и децидуальной ткани плаценты, после экспансии клеток *in vitro* обладают сопоставимо высоким антипролиферативным действием на Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты, ингибируют раннюю и позднюю активацию Т-лимфоцитов и сохраняют иммуносупрессивную активность на поздних пассажах, при этом их супрессивный потенциал сопоставим с потенциалом МСК костного мозга.

В результате проведенного исследования диссертантом показано, что применение биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе МСК плаценты в дозе более 2×10^6 клеток на кг массы тела пациента при проведении иммуносупрессивной терапии острой РТПХ II–IV степени у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток является эффективным, так как обеспечивает достижение общего ответа на лечение более чем у 80% пациентов, что выше, чем при проведении медикаментозной терапии.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационном исследовании для получения достоверных и объективных результатов были применены современные методы, соответствующие высоким стандартам медико-биологических исследований. В частности, использовались: методы культивирования клеток и оценки их пролиферативной активности; метод генетического анализа (STR-анализ); метод проточной цитофлуориметрии; метод замораживания и размораживания клеток и современные методы статистической обработки данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 7, Microsoft Office Excel 2016 и языка R версии 4.3.1 в среде разработки RStudio. Для анализа данных использовали непараметрические методы: для сравнения независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни, или Краскела-Уоллиса; для зависимых выборок – критерий Уилкоксона; для анализа зависимости между показателями применяли коэффициент корреляции Спирмена; для оценки бинарных данных использовали метод анализа таблиц сопряженности по критерию хи-квадрат (χ^2); для определения пороговых

значений использовали ROC-анализ; для анализа связи показателей перинатального анамнеза и объема с качеством пуповинной крови использовали метод логистической регрессии. Применение современных, адекватных методов статистической обработки обеспечивает достоверность, высокую степень доказательности, обоснованность научных результатов, выводов, практических рекомендаций, положений, выносимых на защиту.

Все научные результаты, положения, выводы, рекомендации подтверждены результатами собственных исследований, закономерно вытекают из содержания работы и представляются логичными и убедительными.

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

Научная значимость диссертации Е.Г. Лях заключается в выявлении комплекса прогностических факторов, таких как объем пуповинной крови (40 мл и более), вес новорожденного (3500 г и более) и коллекция материала от первых родов, которые увеличивают шанс получения материала, соответствующего международным стандартам хранения NetCord-FACT.

Научная и практическая значимость работы состоит в исследовании пролиферативной активности МСК, полученных из различных анатомических слоев плаценты, и установлении материала, наиболее перспективного для использования в качестве источника для создания криобанка МСК и наработки биомедицинского клеточного продукта.

Практическая значимость работы заключается в том, что в результате проведенного исследования доказана сопоставимость иммуносупрессивного потенциала МСК плацентарного происхождения с МСК костного мозга, которые традиционно используются в клинической практике, а также сохранность указанных свойств при длительном культивировании клеток, что расширяет возможности применения клеточной терапии для лечения различных заболеваний, поскольку материал плаценты является значительно более доступным источником для создания клеточных продуктов.

Полученные результаты способствуют повышению эффективности лечения пациентов детского возраста с осложнениями трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, что, несомненно, имеет высокую социальную значимость. Создание криобанка МСК плаценты и регистрация биомедицинского клеточного продукта «Клетки мезенхимальные стволовые плаценты человека ТУ ВУ 600395123.002-2023» открывает новые перспективы для комплексной иммуносупрессивной терапии, потенциально применимой для лечения широкого спектра заболеваний, требующих иммуномодуляции.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Полученные в диссертационной работе результаты опубликованы в 13 работах: в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, соответствующих требованиям пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, в 5 статьях в рецензируемых сборниках научных трудов, в 2 материалах конференций, в 2 тезисах, в 1 инструкции по применению. Общий объем опубликованных материалов составляет 4,0 авторских листа.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Оформление диссертации и автореферата соответствует требованиям п.п. 20, 21 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий (Указ Президента Республики Беларусь от 17.11.2004 г. № 560) и Инструкции о порядке оформления диссертации, диссертации в виде научного доклада, автореферата диссертации и публикаций по теме (постановление ВАК Республики Беларусь № 5 от 22.08.2022 г.).

Работа изложена на 146 страницах машинописного текста и содержит 33 рисунка, 24 таблицы. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, общая характеристика работы, аналитический обзор литературы, глава с описанием материалов и методов исследования, 4 главы собственных исследований, заключение, библиографический список, включающий 206 источников и 13 собственных публикаций автора, 12 приложений. Приложения являются копиями подтверждающих документов о новизне разработок и их внедрении в лечебный процесс в ГУ РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Автореферат точно отражает содержание и ключевые положения диссертации, выносимые на защиту.

Имеются единичные опечатки, стилистические погрешности, не влияющие на смысловую сторону диссертации, а также следующие замечания:

1. При указании режимов центрифугирования иногда значения указаны в оборотах в минуту, хотя более корректно указывать значение G (относительная центробежная сила), так как оно не зависит от радиуса ротора центрифуги.

2. В пункте 2.17 «Микробиологический контроль стерильности» при описании контроля стерильности культур МСК указано, что анализ выполняли согласно документу «Микробиологический контроль клеточных продуктов» (Государственная фармакопея Республики Беларусь, том 1, п. 2.6.27, 2002 года), но год указан не верно. Правильное наименование документа (Государственная фармакопея Республики Беларусь, том 1, п. 2.6.27, 2012 года).

3. В таблице 3.4 два раза указан показатель «возраст матери».

В ходе ознакомления с диссертационной работой возникли вопросы, требующие пояснения:

1. При сравнении кумулятивного популяционного удвоения МСК плаценты до и после криохранения вы сравнивали 18 культур до замораживания и 27 культур после замораживания. Почему сравнивали разное количество культур?

2. В разделе материалы и методы указано, что в среду для культивирования клеток добавляли «антибиотик-антимикотик». Поясните, пожалуйста, какой именно антибиотик и антимикотик содержался в растворе.

Указанные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не меняют общую положительную оценку диссертационной работы.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

На основании изучения диссертации, автореферата и опубликованных работ считаю, что диссертация «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения» является самостоятельно выполненной квалификационной научной работой, имеющей внутреннее единство и свидетельствующей о том, что Лях Е.Г. обладает способностью самостоятельно проводить научные исследования и её научная квалификация соответствует искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови.

Заключение

Диссертация Лях Елены Геннадьевны «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения», представленная к защите в совет Д 03.11.01 на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови (отрасль – биологические науки), по актуальности избранной темы, научной новизне, практической значимости полученных результатов, уровню внедрения материалов в практическую деятельность соответствует требованиям п.п. 20, 21 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий (Указ Президента Республики Беларусь №560 от 17 ноября 2004 г. с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Ученая степень кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови может быть присуждена Лях Елене Геннадьевне за:

– установление прогностических критериев, наиболее значимо влияющих на получение образца пуповинной крови, удовлетворяющего установленному международному стандарту NetCord-FACT (содержание ЯСК $\geq 5 \times 10^8$ и CD34⁺ клеток $\geq 1,25 \times 10^6$ в образце);

– доказательство сохранности пролиферативного потенциала МСК плаценты после замораживания и криохранения (-196 °С);

– доказательство, что иммуносупрессивная активность МСК, выделенных из хориона, амниотической оболочки и децидуальной ткани плаценты сопоставима с иммуносупрессивным потенциалом МСК костного мозга;

– доказательство эффективности применения биомедицинского клеточного продукта на основе МСК плаценты при проведении иммуносупрессивной терапии острой реакции «трансплантат против хозяина» II–IV степени у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Официальный оппонент
заведующий клинко-диагностической
лабораторией ГУ РНПЦ ОМР
им. Н.Н. Александрова,
доктор биологических наук, профессор

 Л.А. Державец

«15» 12 2025г.

Подпись
удостоверяю

Инспектор
отдела кадров



 А.А. Мышкова

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Державец Лилии Александровны
на диссертационную работу Лях Елены Геннадьевны «Факторы прогноза
эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток
пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для
клинического применения», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и
переливание крови

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

Содержание диссертационной работы Лях Елены Геннадьевны «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения» по своему содержанию соответствует паспорту специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови, утвержденному приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 23.09.2018г. № 116, а именно п. 1 «Стволовые кроветворные и мезенхимальные клетки и клетки-предшественники гемопоэза», п. 3 «Клинические проявления и лечение заболеваний крови у взрослых и детей: заместительная терапия, химиотерапия, лучевая терапия, иммунотерапия, генная терапия, трансплантация стволовых кроветворных и мезенхимальных клеток, полученных из различных источников, трансфузионная и поддерживающая терапия, комбинированная терапия, механизмы и осложнения терапии, новые методы терапии, в том числе и разработка лекарственных средств, оценка эффективности и экономичности терапии» и п. 7 «Создание банков стволовых кроветворных клеток», а также отрасли «биологические науки».

Название диссертации соответствует ее содержанию, отражает суть цели и задач исследования, а также полученных результатов, выдвигаемых на защиту положений и выводов.

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Лях Елены Геннадьевны посвящена актуальной задаче гематологии: изучению гемопоэтических стволовых клеток и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пуповинно-плацентарного комплекса. В частности, исследование направлено на выявление взаимосвязи между показателями пуповинной крови, факторами перинатального анамнеза и соответствием образцов международным стандартам NetCord-FACT для публичных банков пуповинной крови, установленным для повышения