

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Лях Елены Геннадьевны на тему:
**«Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата
гемопозитических стволовых клеток пуповинной крови и
мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического
применения»**, представленную к защите в совет Д 03.11.01 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

Диссертационная работа Лях Елены Геннадьевны «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопозитических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по цели, задачам, положениям, выносимых на защиту, объекту и предмету исследования, методам исследования, результатам и выводам полностью соответствует паспорту специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови и отрасли «биологические науки», именно п. 1 области исследования паспорта специальности «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», утвержденного приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь от 23.09.2018 № 116.

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

Актуальность темы диссертации

Диссертация Лях Елены Геннадьевны «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопозитических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для

клинического применения» посвящена актуальной проблеме гематологии и переливания крови – исследованию взаимосвязи между количественными показателями образцов пуповинной крови и оценке влияния на эти параметры различных факторов для установления прогностических критериев, повышающих вероятность получения образца соответствующего международным требованиям NetCord-FACT для публичных банков пуповинной крови. Несмотря на исследования в этой области, нет единого мнения о влиянии данных матери и неонатальных показателей новорожденного на количественные параметры пуповинной крови. Поэтому остается актуальным установление надежных прогностических критериев для получения образца, отвечающего международным требованиям, что в дальнейшем может быть использовано для создания публичного банка пуповинной крови в Республике Беларусь.

В диссертационной работе представлены исследования о получении мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из различных анатомических слоев плаценты, проведена оценка пролиферативного потенциала и иммуносупрессивной активности клеток, а также сохранность этих свойств при длительном культивировании и после криохранения, что раскрывает потенциал материала плаценты, как источника для создания криобанка МСК с целью дальнейшей экспансии и получения биомедицинского клеточного продукта для клинического применения. Впервые проведена оценка эффективности применения биомедицинского клеточного продукта на основе МСК плаценты при проведении комбинированной иммуносупрессивной терапии детям с острой реакцией «трансплантат против хозяина» после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, что важно для повышения качества оказания медицинской помощи этой группе пациентов.

Таким образом, вышеизложенное позволяет считать актуальными дальнейшие исследования, направленные на разработку прогностических критериев, определяющих качество заготавливаемых образцов концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови, и исследование функциональных свойств мезенхимальных стволовых клеток плаценты человека и эффективность их применения для иммуносупрессивной терапии.

Тему диссертации 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 следует отнести к своевременным и высоко актуальным.

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:

1. В ходе исследования установлено, что прогностическим критерием, наиболее значимо влияющим на получение образца пуповинной крови, удовлетворяющего установленному международному стандарту NetCord-FAST, является объем нативной пуповинной крови 40 мл и более. Показателями, имеющими прогностическую ценность, также являются вес новорожденного 3500 г и более и первые роды.

2. Диссертант определил, что содержание КОЕ-Ф 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.

3. 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.

4. На основании проведенного исследования показано, что применение БМКП 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

Диссертационная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» в рамках заданий: ГП «Научоемкие технологии и техника» (раздел 2 «Молекулярные и клеточные биотехнологии»): «Усовершенствовать технологию получения и создать криобанк мезенхимальных стволовых

клеток плаценты с высоким иммуносупрессивным потенциалом» (№ госрегистрации 20200204, срок выполнения 2019–2024 гг.); ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» подпрограммы «Клеточная терапия и высокотехнологичные методы замещения поврежденных органов и тканей»: «Разработать и внедрить метод иммуносупрессивной терапии мезенхимальными стволовыми клетками плаценты хронической идиопатической (иммунной) тромбоцитопенической пурпуры и приобретенной апластической анемии у детей» (№ госрегистрации 20213815, срок выполнения 2021–2026 гг.).

В диссертационном исследовании использованы современные методы иммунологического и биотехнологического анализа, а также методы статистической обработки, рекомендуемые для медико-биологических исследований. 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 (Mann-Whitney U Test), или Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis H test) для зависимых выборок – критерий Уилкоксона (Wilcoxon Matched Pairs Test). Для анализа зависимости между показателями применяли коэффициент корреляции Спирмана (r , Spearman Rank Order Correlations). 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. Оценка коэффициента (β) проводилась методом максимального правдоподобия, отношения шансов (OR) рассчитывали по формуле e^β . Для оценки скорректированных вероятностей получения пуповинной крови с установленными требованиями был использован метод модель-базированной стандартизации. Доверительные интервалы получены с помощью непараметрического бустрепа (1000 повторений). Статистическая значимость определялась по тесту Вальда, а 95% доверительные интервалы для OR – методом профильного правдоподобия. 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 и выводы, изложенные в диссертации, соответствуют поставленным цели и задачам исследования,

обоснованы и аргументированы в соответствии с современными литературными данными.

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

Научная значимость диссертации Лях Е.Г. заключается в установлении комплекса прогностических факторов, включающий объем пуповинной крови 40 мл и более, вес новорожденного 3500 г и более и заготовку материала от первых родов, который позволяет получить образец пуповинной крови от доноров Республики Беларусь, удовлетворяющий международному стандарту хранения NetCord-FACT в публичных банках. Кроме того, в доказательстве, что пролиферативный потенциал МСК из децидуальной ткани и хориона плаценты сопоставим и остается высоким при длительном культивировании, обеспечивая преумножение клеток к 9 пассажу более, чем в 10^{10} раз, что в 10^3 раз выше, чем у МСК из амниотической оболочки, с сохранением иммуносупрессивной активности клеток.

Практическая значимость работы заключается в том, что, в результате проведенного исследования, соискателем разработаны и внедрены в практическое здравоохранение технология получения МСК из материала плаценты и технология создания криобанка МСК. Разработанные методики позволяют получить биомедицинский клеточный продукт на основе МСК плаценты с большой дозой клеток и в короткие сроки, минуя длительный этап изготовления персонифицированного биомедицинского клеточного продукта на основе МСК из других источников. Разработанные рекомендации по применению биомедицинского клеточного продукта на основе МСК плаценты улучшают результаты лечения пациентов детского возраста с острой реакцией «трансплантат против хозяина».

Результаты исследования имеют высокую социальную значимость, поскольку они улучшают качество оказания медицинской помощи пациентам детского возраста, перенесшим аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток и снижают тяжесть осложнений у детей (в частности, острую реакцию «трансплантат против хозяина»). Создание доступного биомедицинского клеточного продукта на основе МСК плаценты расширяет возможности для комплексной иммуносупрессивной терапии при широком спектре различных заболеваний.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертационного исследования опубликовано 13 работ: 3 статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих требованиям пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 5 статей в рецензируемых сборниках научных трудов, 2 материалов конференций, 2 тезисов, 1 инструкция по применению. Общий объем опубликованных материалов составляет 4,0 авторских листа.

Степень опубликованности основных положений и полученных результатов диссертационной работы в научных рецензированных изданиях является достаточной, как и апробация результатов работы на научных форумах.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертация Лях Елены Геннадьевны «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения» и автореферат оформлены в соответствии с Инструкцией о порядке оформления диссертации и автореферата, утвержденной постановлением ВАК Республики Беларусь. Диссертация построена традиционно и содержит следующие разделы: введение, общую характеристику работы, аналитический обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, 4 главы собственных исследований, заключение, библиографический список, 206 источников (17 – на русском языке, 189 – на английском языке) и 13 собственных публикаций автора, 12 приложений, включающих инструкцию по применению, регистрационное свидетельство и акты внедрения.

Представленная информация в диссертации подчинена цели исследования, сформулированной автором в соответствии с научным уровнем изложения материала. Материал структурирован, изложен сжато, логично и аргументировано.

Автореферат отражает содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту. Все основные разделы диссертации написаны хорошим русским языком, читаются легко, оформление их соответствует требованиям ВАК Республики Беларусь, предъявляемым к работам такого типа.

Существенных замечаний по оформлению диссертационной работы, а также автореферата, отражающего основное ее содержание, нет.

В ходе ознакомления с диссертационной работой и анализа представленных в диссертации экспериментальных данных возникли вопросы, требующие пояснения:

1. В разделе 4.7 проводилась оценка влияния криогенной температуры на жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток различных пассажей. Как можно объяснить снижение жизнеспособности клеток после размораживания до уровня $81 \pm 9,5 \%$?

2. С чем вы связываете потерю ядродержащих клеток в пуповинной крови во время процессинга образца? Какой способ процессинга является наиболее сохранным в отношении количества ядродержащих клеток? Как можно увеличить их выход по вашему мнению?

В работе встречаются опечатки, некорректная пунктуация; при представлении диаграммы на рисунке 3.5 Б (стр. 65) отсутствует название оси *ou* и единицы измерения; при представлении графика на рисунке 4.8 Б (стр. 87) предпочтительно использование числового формата выражения единиц измерения числа МСК, представленных на оси *ou*.

Высказанные замечания ни в коей мере не умаляют общей высокой оценки рассматриваемой диссертационной работы.

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

Представленные в диссертации материалы свидетельствуют о том, что научная квалификация соискателя полностью соответствует ученой степени кандидата биологических наук. Лях Елена Геннадьевна является высококвалифицированным ученым, способным самостоятельно планировать и успешно выполнять научные исследования в рамках приоритетных научных направлений, обладает способностью самостоятельно решать важные в научном и практическом отношении задачи, грамотно анализирует полученные результаты и обобщает их. Объем, глубина и характер проведенной работы, современный уровень использованных методов исследования, глубокий анализ полученных результатов свидетельствует о полном соответствии научной квалификации.

Диссертационная работа «Факторы прогноза эффективности заготовки концентрата гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток плаценты для клинического применения» отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатской диссертации согласно пунктам 19, 20 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», утвержденного Указом Президента Республики Беларусь №560 от 17.11.2004 г. (в редакции от

01.12.2011 г., Указ Президента №561), а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук, по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови за:

- установление прогностического критерия, наиболее значимо влияющего на получение образца пуповинной крови, удовлетворяющего установленному международному стандарту NetCord-FACT, а именно объема нативной пуповинной крови 40 мл и более, а также показателей, имеющих прогностическую ценность;

- оценку содержания КОЕ-Ф и пролиферативной активности МСК в децидуальной ткани, хорионе и амнионе плаценты, а также установление высокой пролиферативной активности МСК плаценты в течение 9 пассажей после замораживания и криохранения;

- научное доказательство высокого антипролиферативного действия МСК, выделенных из хориона, амниотической оболочки и децидуальной ткани плаценты, после депонирования при криогенной температуре (минус 196°C) и экспансии клеток *in vitro* на Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты, ингибирование ранней и поздней активации Т-лимфоцитов и сохранения иммуносупрессивной активности на поздних пассажах, аналогично потенциалу МСК костного мозга;

- экспериментальное обоснование возможности применения БМКП 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.

Официальный оппонент:

Врач клинической лабораторной диагностики
лаборатории клеточных биотехнологий
ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии
и гематологии», к.б.н.


Е.А. Назарова

15.12.2025 г.


Подпись  устроена
Сектор по кадрам 
15.12.2025