

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента доктора биологических наук**

**Андреевой Елены Ромуальдовны**

**на диссертацию Гринько Екатерины Константиновны**

**«Разработка модели немиелоаблативного кондиционирования при пересадках костного мозга у мышей» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология»**

### **Актуальность исследования**

Диссертация Гринько Е.К. посвящена актуальной проблеме – созданию режима кондиционирования реципиента перед трансплантацией аллогенных тканей и органов с высокой селективностью и низкой токсичностью. Трансплантация аллогенного костного мозга традиционно используется для лечения гематологических заболеваний, а также аутоиммунных заболеваний. Однако с помощью трансплантации аллогенного костного мозга возможно индуцировать иммунную толерантность к тканям и органам того же донора без пожизненной иммуносупрессии и рисков отторжения трансплантата.

Несмотря на перспективность данного метода для трансплантологии, любая аллогенная трансплантация требует подготовки реципиента или кондиционирования для удаления иммунных клеток, ответственных за отторжение трансплантата. Однако стандартные методы кондиционирования основаны на высокодозном облучении и химиотерапии, что влечет за собой тяжелые осложнения для реципиентов. Разработка селективных и малотоксичных режимов кондиционирования реципиента перед трансплантацией позволит избежать тяжелых побочных эффектов и расширит применение трансплантации костного мозга (ТКМ) для индукции иммунной толерантности.

В связи с этим, выбранная автором тема диссертационной работы представляется чрезвычайно актуальной с научной и практической точки зрения.

## **Соответствие темы диссертационной работы паспорту научной специальности**

Тема диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «3.2.7. Иммунология» (Направления исследований: №1; №4; №7).

### **Основные результаты диссертационной работы**

В диссертационной работе представлено несколько протоколов немиелоаблативного кондиционирования реципиентов перед трансплантацией костного мозга. Исследование проводилось на полностью несовпадающих по МНС мышах. Для стандартного режима кондиционирования мышей-реципиентов автор использовала облучение всего тела в дозе 4,5 Гр. В работе показано, что данная доза облучения является минимальной для формирования полного гемопозитического химеризма. Кроме того, в диссертации приведены критерии для оценки химеризма в периферической крови и лимфоидных органах. В ходе дальнейших исследований Гринько Е.К. были разработаны режимы кондиционирования с более низкой дозой облучения в сочетании с применением моноклональных антител против Т-клеток, гемопозитических стволовых клеток (ГСК) и костимулирующей молекулы CD40L. Также автор применила индуктор апоптоза для уменьшения дозы облучения до 1,5 Гр и полного отказа от облучения.

В работе были получены значимые результаты, касающиеся создания смешанного стабильного костномозгового химеризма, обеспечивающего отрицательную селекцию вновь образующихся Т-клеток по антигенам донора и индукцию иммунной толерантности.

Проведена комплексная сравнительная оценка эффективности разработанных режимов кондиционирования по уровню и стабильности донорского химеризма, степени восстановления иммунной системы и способности индуцировать толерантность к аллогенному кожному

трансплантату. Автором установлено, что режимы кондиционирования, которые включают в себя облучение 4,5 Гр, 3 Гр или 1,5 Гр обеспечивают приживание костного мозга и установление полного или смешанного донорского химеризма, но эти режимы с разной эффективностью индуцируют длительную иммунную толерантность к антигенам донора. Режим без облучения обеспечивает формирование смешанного химеризма, но на низких уровнях.

В работе грамотно применена трансплантация аллогенного кожного лоскута для оценки эффективности кондиционирования и приживания костного мозга донора. Показано, что процент Т-лимфоцитов донорского происхождения, связан с характером приживания кожного аллотрансплантата: при количестве Т-клеток донора менее 50% в крови реципиента, кожные трансплантаты приживаются менее эффективно. Этот вывод имеет практическое значение для прогноза выживаемости трансплантата.

Автором детально изучено восстановление иммунной системы реципиентов после разработанных режимов кондиционирования, выявлена повышенная чувствительность CD4<sup>+</sup>-Т-клеток к иммуносупрессивным воздействиям по сравнению с CD8<sup>+</sup>-Т-клетками, что выражено в более медленном восстановлении этой субпопуляции. Автором установлено, что сублетальные дозы облучения приводят к избирательному нарушению восстановления Т-клеточного звена в лимфоузлах без существенного влияния на тимус, костный мозг и селезенку. Показано, что восстановление численности субпопуляции Т-клеток происходит без конверсии фенотипа наивных клеток в фенотип клеток памяти. Эти данные углубляют понимание механизмов восстановления иммунной системы после трансплантации цельного костного мозга.

Таким образом, разработанные автором селективные протоколы кондиционирования реципиентов являются менее токсичными по сравнению со стандартным кондиционированием с помощью облучения в дозе 4,5 Гр.

## **Достоверность полученных результатов**

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Цель и задачи четко сформулированы. В работе использованы современные методы исследования, выполненные на сертифицированном оборудовании, полностью соответствуют цели и поставленным задачам. Полученные данные обработаны с применением адекватных статистических методов и достоверны.

## **Научная новизна диссертационной работы**

Новизна работы Гринько Е.К. заключается в новом подходе к селективному кондиционированию реципиентов перед аллогенной трансплантацией костного мозга. Подход основан на сочетанном применении подобранной автором комбинации моноклональных антител, которые обеспечивают селективное истощение целевых субпопуляций, и индуктора апоптоза.

Впервые проведена сравнительная оценка эффективности стандартного режима кондиционирования, основанного на высокодозном облучении, и селективных режимов кондиционирования у выбранной линии мышей-реципиентов. Критериями оценки эффективности послужили уровень и стабильность донорского химеризма, динамика восстановления иммунной системы и индукции толерантности к антигенам донора.

Установлено, что как стандартный высокодозный режим кондиционирования, так и селективные режимы кондиционирования, позволяют достичь устойчивого смешанного или полного донорского химеризма, но не все режимы способны индуцировать длительную иммунную толерантность к аллотрансплантату кожи.

## **Теоретическая значимость диссертационной работы**

С позиций фундаментальной иммунологии, значимость представленной работы заключается в установлении связей между уровнем донорского

химеризма и толерантностью к аллогенным трансплантатам. Также установлены связи между режимом кондиционирования и последующим восстановлением иммунной системы.

Проведенное исследование позволяет утверждать, что различные субпопуляции Т-клеток у мышей-реципиентов обладают различной чувствительностью к действию облучения, введению моноклональных антител и индуктора апоптоза и дальнейшей аллогенной ТКМ.

Важным теоретическим достижением является доказательство того, что индукторы апоптоза, блокирующие белок Vcl-2, могут быть эффективны не только в онкогематологии, но и в трансплантологии с минимальными побочными эффектами.

Таким образом, полученные результаты вносят вклад в приобретение новых знаний о механизмах восстановления костномозговых клеточных ниш и органов иммунной системы реципиента после кондиционирования и трансплантации.

### **Практическая значимость диссертационной работы**

Практическая значимость работы подтверждается получением новых экспериментальных моделей индукции иммунной толерантности у реципиентов. Для достижения этого автором предложено использовать селективное кондиционирование.

С практической точки зрения, наиболее весомым результатом является то, что разработанные протоколы кондиционирования имеют преимущество по сравнению со стандартным кондиционированием с точки зрения минимизации побочных эффектов, индукции иммунной толерантности и установления смешанного химеризма, который характеризуется низким риском развития РТПХ. Внедрение полученных данных в клиническую практику в перспективе обеспечит доступность и безопасность трансплантации костного мозга для формирования толерантности к другим аллогенным тканям и органам.

Таким образом, полученные автором результаты вносят значительный вклад как в развитие фундаментальной иммунологии и трансплантологии, так и в создание новых терапевтических стратегий в практике.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Гринько Е.К.. изложена на 130 страницах текста и имеет традиционную структуру: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, анализ полученных результатов, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Диссертация содержит 32 рисунка и 12 таблиц. Библиография включает 105 источников, из них 8 русскоязычных и 97 иностранных.

Во введении представлены актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Глава «Обзор литературы» исчерпывающе раскрывает тему диссертации теоретически. Глава «Материалы и методы» описывает методы исследования, использованные для данной работы. В главе «Результаты» представлены описания и схемы протоколов кондиционирования, а также описана способность разработанных протоколов формировать гемопоэтический химеризм и индуцировать толерантность к тканям донора. Оценено влияние кондиционирования и ТКМ на скорость и полноту восстановления иммунной системы. В главе «Обсуждения» приведен анализ полученных данных и сопоставление их с результатами других научных групп. Выводы четко сформулированы. В заключении приведены итоги, перспективы и рекомендации.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 6 печатных работах, в том числе 6 статьях в рецензируемых научных журналах, которые включены в перечень периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет, тем не менее при ознакомлении с работой возникли некоторые вопросы замечания технического характера.

Вопросы:

1. Что известно о вкладе клеток стромы костного мозга (реципиента и донора) в успешность приживления костного мозга в изученных вариантах аллогенной трансплантации.
2. Каковы возможность и перспективы адаптации предложенных подходов в клинике?
3. У человека при трансплантации костного мозга учитывают антигенную совместимость по HLA-антигенам. Как это реализуется у животных?
4. Почему на рисунках, в которых данные представлены как медиана  $\pm$  IQR, нет обозначения достоверных отличий?

Замечания:

1. В разделе «Материалы и методы» было бы уместно дать сводную таблицу по использованным антителам с указанием определяемых антигенов.
2. В работе присутствуют стилистические и орфографические ошибки.

### **Заключение**

Диссертационная работа Гринько Е.К. «Разработка модели немиелоаблативного кондиционирования при пересадках костного мозга у мышей «3.2.7. Иммунология» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных научных задач, имеющих значение для иммунологии: доказана связь между степенью влияния на ГСК и периферические Т-клетки реципиента и успешностью приживления аллотрансплантата кожи; создано 3 режима немиелоаблативного кондиционирования реципиентов, которые обеспечивают формирование смешанного гемопозитического химеризма после ТКМ; получены данные о

восстановлении иммунной системы реципиентов при использовании полученных режимов кондиционирования, включающих в сопоставлении с высокодозным облучением; полученные модели в перспективе могут быть использованы в доклинических исследованиях на крупных животных.

Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в актуальной редакции, а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «3.2.7. Иммунология».

Официальный оппонент,

ведущий научный сотрудник лаборатории

клеточной физиологии

ФГБУН ГНЦ РФ – ИМБП РАН Минобрнауки России,

доктор биологических наук, доцент

*Андреева*  
12.03.26

Андреева Е.Р.

Подпись д.б.н. Андреевой Е.Р. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУН ГНЦ РФ – ИМБП РАН Минобрнауки России,

доктор биологических наук



*Левинских*  
Левинских М.А

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук; Адрес: 123007, г. Москва, Хорошёвское ш., д. 76А; Тел.: +7 (499) 195-2363  
e-mail: doc@imbp.ru