

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук
Бигильдеева Алексея Евгеньевича 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

Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) или костного мозга (аллоТКМ) остается одним из ключевых методов лечения широкого спектра злокачественных новообразований кроветворной и лимфоидной ткани, аутоиммунных и наследственных заболеваний. аллоТГСК/ТКМ рассматривается как перспективный подход для индукции трансплантационной толерантности, потенциально позволяющей отказаться от пожизненной иммуносупрессии при пересадке солидных органов. Однако широкое клиническое применение аллоТКМ для этой цели ограничено высокой токсичностью классических режимов предтрансплантационного кондиционирования, основанных на применении высоких доз цитостатиков и тотального облучения тела (ТОТ). Эти воздействия неселективно поражают быстро пролиферирующие клетки, приводя к тяжелым побочным эффектам и создавая риск развития вторичных опухолей и клинически значимой острой и/или хронической реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), которая остается одной из основных причин смертности пациентов после аллоТГСК наравне с инфекционными осложнениями, которые являются следствием глубокого агранулоцитоза и подавления иммунной системы реципиента в ранний посттрансплантационный период в виду миелоаблативных режимов кондиционирования.

В связи с этим, разработка новых, более безопасных и селективных протоколов предтрансплантационного кондиционирования является одной из приоритетных задач современной иммунологии, трансплантологии и гематологии. Особый интерес представляет создание немиелоаблативных режимов, которые позволяют добиться приживления донорских гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и формирования химеризма при минимальном повреждении тканей реципиента. В трансплантологии это открывает возможность сочетанной трансплантации солидных органов и костного мозга от одного и того же донора без необходимости пожизненной иммуносупрессии. В гематологии это открывает дорогу к созданию более безопасных протоколов не только аллогенной, но и аутологичной трансплантации КМ, поскольку такие режимы более щадящие по отношению к стромальной компоненте. Диссертационная работа Гринько Е.К., направленная на разработку и сравнительный анализ именно таких подходов, является своевременной и несомненно актуальной.

Соответствие темы диссертационной работы паспорту научной специальности

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

Основные результаты диссертационной работы

В рамках проведенного исследования продемонстрирован нестандартный подход к индукции иммунной толерантности у реципиентов с помощью трансплантации аллогенного костного мозга. Для этого были разработаны протоколы немиелоаблативного кондиционирования реципиентов, включающие сниженные дозы ТОТ или полностью исключают облучение в сочетании с моноклональными антителами и индукторами апоптоза. Показаны значимые результаты, касающиеся создания смешанного костномозгового химеризма, который обеспечивает создание иммунной толерантности к органам и тканям донора.

Автором проведено сравнение разработанных протоколов для кондиционирования по степени эффективности и влияния на иммунную систему. Убедительно показана эффективность моноклональных антител против цитотоксических Т-лимфоцитов при их сочетанном применении с сублетальным облучением, дозу которого удалось существенно снизить при комбинировании с антителами. Также продемонстрирована перспективность использования индуктора апоптоза венетоклакса, ингибирующего белок Bcl-2, в сочетании с ТОТ или моноклональными антителами против ГСК и Т-клеток. Оценена эффективность каждого из представленных режимов кондиционирования по частоте возникновения и уровню костномозгового химеризма.

Показано, что процент Т-клеток донорского гаплотипа в крови реципиентов на поздние сроки тестирования связан с качеством приживления донорского кожного алло-лоскута. Этот показатель может быть использован как прогностический маркер.

Важным разделом результатов является исследование численности и субпопуляционного состава иммунных клеток в лимфоидных органах реципиентов. Автором показано, что селективные протоколы кондиционирования не оказывают влияния на центральные и периферические органы иммунной системы, либо оказывают незначительное влияние на лимфоузлы реципиентов. Автор связывает этот факт с большей чувствительностью лимфоузлов к действию радиации по сравнению с костным мозгом и тимусом. Также отмечена большая чувствительность CD4⁺ Т-клеток к облучению в дозе, превышающей 1,5 Гр по сравнению с CD8⁺ Т-клетками, что подтверждено замедленным восстановлением этой субпопуляции в лимфоузлах. Впрочем, это может быть связано с особенностью восстановления стромы лимфоузлов и функционированием ниш для CD4⁺ Т-клеток.

Также в работе с помощью селективного кондиционирования удалось добиться смешанного устойчивого гемопоетического химеризма, который детектировался до конца периода наблюдения и во всех исследуемых лимфоидных органах.

Важным результатом диссертации является демонстрация того, что индукция апоптоза с помощью венетоклакса может быть адаптирована для кондиционирования реципиентов при минимальных рисках развития побочных эффектов.

Разработанные протоколы кондиционирования демонстрируют преимущество перед традиционными методами благодаря сниженной токсичности. Они открывают путь к созданию новых схем аллогенной трансплантации, минимизирующих риски тяжелой РТПХ, осложнений и отторжения трансплантата. В перспективе представленная концепция позволяет разрабатывать методы пересадки солидных органов, не требующие постоянного приема иммуносупрессоров. Более того, теоретически, разработанные подходы могут стать заделом к изолированной трансплантации стромы костного мозга, без необходимости трансплантации кроветворной системы.

Достоверность полученных результатов

Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне на сертифицированном оборудовании с применением современных методов исследования, адекватных поставленным цели и задачам. Все исследования грамотно спланированы, результаты исследования обработаны с применением адекватных статистических методов, достоверность установлена.

Научная новизна диссертационной работы

В работе впервые проведено систематическое сравнение пяти различных протоколов кондиционирования мышей линии BALB/c перед аллогенной трансплантацией костного мозга от доноров-мышей линии C57BL/6. Безусловной научной новизной обладает разработанный автором оригинальный режим, сочетающий применение моноклональных антител (против CD8, CD4, CD117, CD40L) и ингибитора V α 1-2 венетоклакса, который полностью исключает использование облучения.

Автором впервые детально охарактеризовано влияние различных режимов на качественные и количественные параметры формирующегося химеризма в различных субпопуляциях лейкоцитов (Т- и В-лимфоцитах, гранулоцитах, моноцитах) в динамике в периферической крови на протяжении 90 и в разных лимфоидных органах (кровь, костный мозг, тимус, селезенка, лимфоузлы) суток и в конечной точке на 180 сутки. Это позволило получить новые фундаментальные данные о корреляции между режимом кондиционирования, глубиной повреждения иммунной системы реципиента и последующим ее восстановлением. Важным результатом является установление факта, что не все режимы, приводящие к

формированию стабильного смешанного химеризма, способны индуцировать долговременную толерантность к высокоиммуногенному аллогенному кожному трансплантату. Это подчеркивает сложность и многофакторность процессов индукции толерантности на периферии.

Теоретическая значимость диссертационной работы

Теоретическая значимость работы заключается в углублении понимания механизмов иммунной реконституции после различных по интенсивности и селективности режимов кондиционирования. Автором убедительно показана дифференциальная чувствительность субпопуляций Т-клеток ($CD4^+$ более чувствительны, чем $CD8^+$) и различных лимфоидных органов (лимфоузлы более радиочувствительны, чем тимус и селезенка) к повреждающему действию используемых протоколов. Эти данные важны для понимания фундаментальных процессов функционирования и восстановления иммунной системы.

Таким образом, полученные в диссертационной работе результаты вносят вклад в развитие фундаментальной иммунологии и формируют научную базу для совершенствования протоколов кондиционирования.

Практическая значимость диссертационной работы

Практическая значимость работы неоспорима. Разработанные и апробированные протоколы кондиционирования, в особенности режим с использованием TOT 3 Гр в комбинации с анти-CD8 и анти-CD40L МАТ, представляют собой эффективную и менее токсичную альтернативу классическому сублетальному облучению для получения химерных животных в доклинических исследованиях. Показанная возможность индукции долговременной толерантности к кожному аллотрансплантату открывает перспективы для дальнейшей трансляции этих подходов в клиническую практику, где они могут стать основой для разработки протоколов комбинированной трансплантации костного мозга и солидных органов, направленных на отказ от пожизненной иммуносупрессии. Полученные результаты уже внедрены в научную и образовательную деятельность ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Исходя из вышеперечисленного, можно констатировать, что результаты обладают практической значимостью для адаптации в клиническую практику.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 130 страницах машинописного текста, хорошо иллюстрирована 32 рисунками и содержит 12 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, главы результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 105 источников (8 отечественных и 97 зарубежных).

Обзор литературы написан профессионально, демонстрирует глубокое понимание автором современного состояния проблемы. Обзор логично подводит к обоснованию необходимости проведения данного диссертационного исследования.

Глава «Материалы и методы исследования» подробно описывает дизайн всех пяти экспериментальных моделей, использованные линии животных, МАТ, препараты и методы исследования (облучение, трансплантации, проточная цитометрия, статистика). Описание методов воспроизводимо и не вызывает вопросов.

Глава «Результаты» содержит основной фактический материал. Результаты изложены последовательно и логично, в соответствии с поставленными задачами. Приведены данные по подбору доз облучения, динамике формирования химеризма в разных клеточных популяциях, оценке восстановления лимфоидных органов и, что особенно важно, по выживаемости кожных аллотрансплантатов. Рисунки и таблицы наглядно демонстрируют полученные закономерности.

В главе «Обсуждение» автор проводит глубокий и критический анализ полученных результатов, сопоставляя их с данными литературы. Убедительно показаны преимущества и недостатки каждого из разработанных протоколов. Особый интерес представляет обсуждение феномена расщепленной толерантности и причин, по которым низкие уровни химеризма не всегда обеспечивают приживление кожи.

Заключение и выводы полностью соответствуют цели и задачам исследования, логично вытекают из полученных результатов и являются обоснованными.

Сильной стороной работы является ясность в понимании актуальности постановки задач и глубокое знание молекулярных и клеточных основ центральной и периферической иммунологической толерантности. Это выливается в хорошо составленный литературный обзор, грамотное выделение ключевых объектов и параметров для анализа, четкое планирование и выполнение экспериментов, последовательный анализ и синтез результатов, адекватные выводы.

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. Это значительно превышает требования, предъявляемые к кандидатским диссертациям по биологическим наукам, и свидетельствует об актуальности и научной значимости полученных результатов. Материалы работы неоднократно докладывались и обсуждались на всероссийских и международных научных конференциях.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Несмотря на общую положительную оценку работы, есть несколько вопросов и замечаний.

Вопросы:

1. В работе автор разработал предтрансплантационные режимы кондиционирования, основанные на комбинации моноклональных антител (к CD8, CD40L), проапоптотического препарата (венетоклакс) и тотального облучения тела в сниженных дозах (1,5 и 3 Гр). Как вы считаете, возможно ли в перспективе полностью отказаться от облучения? Какие для этого должны быть выполнены условия?
2. В ходе выполнения работы автором были получены любопытные данные об изменении в субпопуляций наивных Т-лимфоцитов и Т-лимфоцитов центральной памяти, которые говорят в пользу того, что при использованных подходах к трансплантации не происходит значимой гомеостатической пролиферации лимфоцитов. Почему эти наблюдения не вошли в выводы?
3. Одной из целей работы была разработка способа кондиционирования пониженной токсичности с целью формирования устойчивого донорского химеризма (ДХ) для приживления аллогенной ткани/органа. ДХ измеряли в крови на 14-е, 28-е, 56-е и 90-е сутки, хотя мышей выводили из эксперимента только на 180 сутки. И было бы очень любопытно посмотреть, что было с ДХ на +180 день. Это бы позволило установить устойчивость ДХ во времени.
4. ГСК – достаточно гетерогенная и редкая клеточная субпопуляция КМ. Различные исследователи придерживаются различных критериев мышинных ГСК по их поверхностному фенотипу. Минимальным считается фенотип LSK (Lin-Sca-1+c-Kit+) клетки. В представленной работе для характеристики ГСК использовалось только антитело к CD117 (C-Kit), и поскольку CD117 не является специфичным маркером для ГСК, достаточно сложно говорить об оценке этой субпопуляции в КМ у мышей. Почему выбор пал на этот антиген?

Замечания

1. В тексте есть некоторые неточности: на стр. 16 «При аллогенной ТГСК (аллоТГСК) стволовые клетки берут от полностью МНС-несовместимого донора. При такой трансплантации развивается эффект «трансплантат против опухоли», когда здоровые иммунные клетки донора распознают злокачественные клетки реципиента как чужеродные и развивают на них иммунный ответ». В действительности же аллоТГСК классифицируется по степени совпадения МНС антигенов: полностью совместимая, частично совместимая или гаплоидентичная (наполовину совместимая). При таких аллоТГСК, даже полностью совместимых, эффект трансплантат-против-опухоли является лишь одним из факторов, приводящих к элиминации опухолевых клеток. Роль индукционной терапии и предтрансплантационного кондиционирования здесь невозможно не учитывать.
2. Несмотря на явные различия в значениях ДХ в разные временные точки по каким-то непонятным причинам не произведен статистический анализ внутри каждой группы для различных временных точек. Таким образом приведенные значения медиан могут лишь наглядно демонстрировать тенденции.

3. Очень не хватает иллюстраций с аллогенными трансплантатами кожи и численной обработки результатов по ним.

Указанные замечания не снижают ценность полученных результатов и не являются критическими.

Заключение

Диссертационная работа Гринько Екатерины Константиновны на тему «Разработка модели немиелоаблативного кондиционирования при пересадках костного мозга у мышей» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных научных задач, имеющих значение для иммунологии: теоретическое обоснование механизма индукции толерантности через трансплантацию костного мозга; показана связь между степенью приживления костного мозга и периферической толерантностью к тканям донора; проведена разработка и экспериментальная демонстрация новых малотоксичных режимов кондиционирования, обеспечивающих формирование донорского химеризма и индукцию иммунной толерантности.

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, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной клеточной биологии и оптогенетики Центра исследования молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний ЛФИ МФТИ, доктор биологических наук,



Бигильдеев А.Е.

Подпись д.б.н. Бигильдеева А.Е. заверяю:

Ученый секретарь, к.ф.-м.н., доцент

« 17 » марта 2026 г.



Евсеев Е.Г.

Контактная информация: Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний МФТИ; Адрес: 1417019, Московская область, Долгопрудный, ул. Первомайская, д. 3; Тел: 8(910)432-28-70; e-mail: bigildeev.ae@yandex.ru