

## ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, професора Курченка Андрія Ігоровича, завідувача кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики НМУ імені О. О. Богомольця на дисертаційну роботу Нікольської Катерини Ігорівни «Стимуляція регенерації імунної системи опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин і прогеніторів, преінкубованих з мультипотентними стромальними клітинами тимуса», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – імунологія та алергологія

### 1. Актуальність теми дисертації.

Трансплантація стовбурових клітин розглядається як один із найефективніших підходів до стимуляції регенерації імунної системи. Основними об'єктами дослідження, звичайно, є гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) –джерело усіх клітин імунної системи. Але останнім часом велика увага надається також мультипотентним стромальним клітинам (МСК), особливо кістково-мозкового походження, їх регуляторним властивостям і регенеративній дії. У фізіологічних умовах МСК є основними клітинними елементами кістковомозкових ніш. Утворюючи міжклітинні контакти і секретиючи цитокіни, вони підтримують ГСК, сприяючи їх самовідновленню і виходу у диференціювання з реалізацією поліпотентності.

Виявилось також, що МСК потрібні для функціонування ще одного центрального органу імунної системи – тимуса, який є унікальним місцем утворення Т-лімфоцитів.

На відміну від кістковомозкових, МСК тимуса вивчені значно менше. Але відомо, що вони відіграють велику роль в ембріональному органогенезі тимуса. У дорослому тимусі приймають участь у формуванні ніш, де завдяки міжклітинній контактній взаємодії сприяють розвитку попередників Т-лімфоцитів до ранніх стадій тимоцитів, їх селекції і міграції. Тимусні, але не кістковомозкові МСК, виражено стимулюють антитілогенез *in vitro* і *in vivo*.

МСК тимуса також відрізняються від стромальних клітин іншої локалізації своїм подвійним походженням: мезодермальним і ектодермальним (із нейрального гребінця). А аналіз транскриптому МСК тимуса у порівнянні з вмістом транскриптів у дермальних і кістковомозкових МСК показав, що у них суттєво підвищена експресія генів, відповідальних за взаємодію з епітелієм (як у дермальних МСК), забезпечення гемопоезу (як у кістковомозкових МСК) і ефероцитозу.

Таким чином, можна припустити, що особливі властивості МСК тимуса порівняно з краще вивченими кістковомозковими і дермальними МСК можуть мати відмінні регенеративні і регуляторні властивості. Але загальним за механізмами впливу на ГСК кістковомозкових і тимусних МСК є необхідність для його здійснення контактної міжклітинної взаємодії цих клітин.

З урахуванням зазначеного виявилась перспективність отримання нових даних з регенерації імунної системи на основі вивчення кооперативної контактної взаємодії ГСК і недостатньо вивчених у цьому відношенні МСК тимуса.

Найбільш адекватною моделлю для проведення відповідних експериментів може вважатися імунодефіцит, індукований летальним опроміненням тварин. Головними ланками його патогенезу є формування кістковомозкового синдрому на основі клітинного спустошення органів гемоімунопоезу. В результаті організм втрачає здатність протистояти агресії мікрофлори, що потрапляє у внутрішнє середовище організму внаслідок вираженого променевого порушення епітеліального бар'єру кишківника.

Відновлення імунного захисту відповідає ефективності регенерації імунної системи і може бути об'єктивно оцінена.

## **2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних тем «Вивчити особливості направленої диференціювання стовбурових клітин та клітин-попередників у нейрональні, ендотеліальні клітини та

остеобласти/остеокласти з метою їх подальшого застосування для трансплантації» (номер державної реєстрації 01070008763), «Вивчити деякі механізми взаємодії мультипотентних стромальних і гемопоетичних стовбурових клітин та залежні від їх властивостей процеси диференціювання лімфоцитів» (номер державної реєстрації 0110U002200), «Вивчити механізми імуноткорекції при спільному застосуванні гемопоетичних стовбурових і мультипотентних стромальних клітин» (номер державної реєстрації 0113U000102) лабораторії імунології ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», в яких дисертант брала участь як виконавець окремих фрагментів.

### **3. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність.**

Наукові положення, висновки та перспективи практичного застосування, сформульовані у дисертації Нікольської К.І., ґрунтуються на отриманих результатах експериментальних досліджень, проведених з використанням 519 мишей лінії СВА. Наукові положення та висновки дисертації є цілком достовірними та обґрунтованими застосуванням сучасних і високоінформативних методів дослідження стовбурових клітин та імунної системи із залученням адекватних статистичних методів. Вони повністю відповідають меті та завданням дослідження.

### **4. Наукова новизна основних положень, висновків та практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень і одержаних результатів.**

Вперше розроблена модель для вивчення контактної взаємодії МСК і гемопоетичних клітин *in vitro* на основі виявленої їх мембранної спорідненості, яка проявляється, як виявлено, формуванням фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР). Вперше показано, що трансплантація сингенних МСК продовжує виживаність летально опромінених мишей і проявляє виражену імунорегенеративну активність. Вперше встановлено, що

в результаті попередньої контактної взаємодії з МСК тимуса підвищується регенеративна, імунологічна і радіозахисна активність ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки при трансплантації клітин летально опроміненим мишам.

#### **5. Практичне значення одержаних результатів.**

Результати можуть бути використані в лабораторній роботі з різними типами гемопоетичних клітин і МСК в культурі *in vitro*. Отримані дані також можуть бути основою для розробки способів підвищення ефективності клінічної трансплантації ГСК і прогеніторів шляхом попередньої інкубації цих клітин з МСК тимуса. Результати наголошують і на реальну можливість застосування МСК тимуса для проведення імунотерапії при гемоімунодефіцитах. Практичне значення мають дані про збереження належної активності кріоконсервованими клітинами.

#### **6. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.**

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи Нікольської К.І. повністю висвітлено у 25 опублікованих наукових працях, серед яких 7 статей у наукових фахових виданнях (у т.ч. з них 2 статті у виданнях, що входять до наукометричної бази даних Scopus), 4 статті у інших наукових виданнях, 2 патенти на корисну модель, 12 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

#### **7. Структура дисертації.**

Матеріали дисертації викладено на 221 сторінці комп'ютерного тексту. Робота складається з анотації, переліку умовних скорочень, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку

джерел використаної літератури (всього - 359 джерел; з них кирилицею - 59, латиницею - 300). Роботу ілюстровано 11 таблицями, 18 рисунками та 7 фотографіями.

Назва дисертації, її мета та завдання відповідають спеціальності наукової роботи - 14.03.08 – імунологія та алергологія.

У **вступі** розкрито актуальність обраної теми, її зв'язок з плановою науковою тематикою ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», сформульовано мету та завдання роботи, відображено наукове та практичне значення дисертаційних досліджень.

**Розділ 1** «Контактна взаємодія ГСК і прогеніторів з МСК тимуса у формуванні та функціонуванні імунної системи» складається з двох підрозділів, викладених на 29 сторінках:

1.1. МСК та їх похідні у структурі і функціонуванні кістковомозкових ніш ГСК.

1.2. МСК тимуса; участь у формуванні органу і функціонуванні імунної системи.

Підрозділи включають кілька пунктів і підпунктів.

Підрозділ 1.1 «МСК та їх похідні у структурі і функціонуванні кістковомозкових ніш ГСК» складається із трьох пунктів. Пункт 1.1.1 «Гемопоетичне мікрооточення» присвячене викладенню даних про стромальне мікрооточення ГСК. Показана велика роль у підтримці ГСК і гемопоезу МСК, особливо контактуючих з ГСК.

У пункті 1.1.2. «Ендостальна ніша» висвічується роль похідних МСК – остеобластів. Показано, що головну роль в ендостальній ніші ГСК відіграють незрілі остеобласти, так звані SNO-клітини (spindle-shaped N-cadherin+CD45-osteoblastic cells).

У пункті 1.1.3 «Судинна ніша» аналізується в основному роль інших похідних МСК – CAR-клітин (CXCL12-abundent reticular cells), які мають довгі відростки, що пронизують паренхіму кісткового мозку і мають велике значення не тільки у підтримці ГСК, а і в созріванні В-клітин, НК-клітин і

плазмацитоїдних дендритних клітин (підпункт 1.1.3.1). Розглядається також роль Nestin<sup>+</sup>-, Lepr<sup>+</sup>-клітин і перицитів (підпункт 1.1.3.2), а також ендотеліальних клітин (підпункт 1.1.3.3), які відіграють найбільшу роль у підтримці довготривало репопулюючих ГСК (ДР-ГСК).

У підрозділі 1.2 розглядається участь МСК тимуса у формуванні органу і функціонування імунної системи. Висвітлюються основні загальні властивості МСК (пункт 1.2.1), функціональні особливості МСК тимуса, участь в ембріональному органогенезі і функціонуванні дорослого тимуса (пункт 1.2.2), а також взаємодія МСК і гемопоетичних клітин у функціонуванні імунної системи (пункт 1.2.3).

**Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень».** Викладений на 19 сторінках. У цьому розділі надані методики одержання клітин, їх кріоконсервування і лінійного диференціювання. Для вивчення імунної системи застосовані методики визначення клітинності органів, кількості КУО-Ф, дослідження поглинальної активності макрофагів з міченим флуорохромом стафілококами, бактерицидної активності в НСТ-тесті, дослідження синтезу  $\alpha/\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферонів, спонтанного і індукованого ЛПС ФНПа, дослідження природної активності НК-клітин МТТ-методом, активності ГСТ в інфільтративно-запальній реакції, РБТЛ, вмісту в селезінці АУК та гемолізинів і гемаглютининів у сироватці крові. Дослідження виживаності летально опромінених мишей, що отримували різні клітинні трансплантати проводили протягом 16 тижнів.

**Розділ 3 «Вивчення деяких властивостей МСК тимуса і клітин фетальної печінки мишей in vitro. Фібробласто-лімфоцитарні розетки».** Розділ присвячений викладенню методик оптимізації одержання залучених у роботу клітин і вивченню деяких їх властивостей, зокрема контактної взаємодії, яка має вирішальне значення для розвитку ГСК у кістковому мозку, тимусі і, певною мірою, у периферичній частині імунної системи. Окреме значення надавалось дослідженню стійкості клітин до кріоконсервування, оскільки часто схеми експериментальних досліджень потребують достатньо великої кількості клітин для використання за досить короткий проміжок часу, яка

може бути забезпечена саме кріоконсервуванням. Також можливість кріоконсервування відкриває перспективи створення препаратів, які можуть бути застосовані у клініці і експерименті одразу після розмороження у будь-який час.

МСК тимуса ефективно розмножувалися з обох боків целофанової пластинки, а на скляній або пластиковій поверхні нарощувалися із експлантатів органу. Показано, що МСК тимуса ефективно диференціюються у спеціальних середовищах по остео- і адипогенному напрямках. Встановлено, що *in vitro* МСК тимуса і гемопоетичні клітини формують фібробласто-лімфоцитарні розетки. Найбільшою активністю володіють тимоцити, що підтверджує найбільшу мембранну спорідненість незрілих Т-клітин.

**Розділ 4** «Вплив контактної взаємодії клітин кісткового мозку і фетальної печінки з МСК тимуса на радіозахисну активність гемопоетичних клітин». Були досліджені наступні клітинні препарати:

1. Кондиційне середовище (КС) культури *in vitro* МСК тимуса і КФП (n=14).
2. ГСК і прогенітори кісткового мозку мишей (ККМ) (n=16).
3. ГСК і прогенітори кісткового мозку мишей, преінкубовані з МСК тимуса (iККМ) (n=16).
4. ГСК і прогенітори фетальної печінки мишей (КФП) (n=15).
5. ГСК і прогенітори фетальної печінки мишей, преінкубовані з МСК тимуса (iКФП) (n=14).
6. МСК тимуса мишей лінії СВА (n=16).

Контрольні опромінені миші не отримували ніяких препаратів. За тваринами спостерігали 16 тижнів.

Встановлено, що преінкубовані з МСК тимуса ГСК і прогенітори кісткового мозку та фетальної печінки значно ефективніші у відношенні виживаності тварин, ніж нормальні клітини. Важливо, що також вперше показано, що підвищення виживаності спостерігається і в результаті трансплантації самих МСК тимуса.

**Розділ 5** «Вплив на імунну систему опромінених мишей трансплантації МСК тимуса та преінкубованих контактною взаємодією з ними ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки» викладений на 26 сторінках.

В результаті проведених досліджень вимальовується велика роль, яку грають МСК в регенерації імунної системи. Природно виділяються два аспекти. По-перше, трансплантовані опроміненим мишам МСК тимуса самі по собі сприяють суттєвому відновленню імунної системи. По-друге, МСК тимуса володіють властивостями, що при контактній взаємодії з ГСК і прогеніторами кісткового мозку або фетальної печінки індукують у гемопоетичних клітин підвищену регенеративну і імуномодуючу активність, що у подальшому може бути використано для підвищення ефективності імунотерапії стовбуровими клітинами.

**Розділ 6** «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» викладений на 22 сторінках. Він присвячений аналізу отриманих результатів і зіставленню їх з даними літератури. Проведений аналіз свідчить про наукову зрілість автора дисертації, його здатність аналізувати результати досліджень та представляти їх у висновках.

**Висновки** повністю відображають усі наукові положення дисертації. Вони ґрунтовні і віддзеркалюють одержані у дисертаційній роботі результати та повністю відповідають задачам проведених досліджень.

**Практичні рекомендації** чітко рекомендують розроблену удосконалену і експериментально обґрунтовану методику застосування кріоконсервування для накопичення клітинних трансплантатів. Також рекомендуються нові методики для використання взаємодії ГСК і МСК і створення нових підходів до клітинної терапії імунодефіцитів. Вони конкретні та можливі для впровадження у практичну діяльність наукових лабораторій та у педагогічному процесі.

Список використаної літератури містить сучасні фахові публікації з досліджуваної тематики вітчизняних і зарубіжних авторів, відповідає

сучасним вимогам щодо оформлення літературних джерел.

Дисертаційна робота Нікольської К.І. написана українською фаховою мовою, побудована логічно, читається з цікавістю. Зміст автореферату ідентичний тексту дисертації. Автореферат містить всі наукові положення та висновки дисертаційної роботи.

При ознайомленні з дисертацією виникли наступні зауваження та запитання до дисертанта:

**Зауваження:**

У дисертаційній роботі зустрічаються повтори окремих положень, що, тим не менше, не зменшують наукової та практичної цінності дисертаційної роботи та стилю її викладення.

**Запитання:**

1. Чим Ви керувалися при виборі моделі імунodefіциту?
2. Чим був обґрунтований вибір МСК тимуса для вивчення регенерації імунної системи опромінених мишей?

Вказані зауваження та запитання стосується переважно способів моделювання імунodefіцитів, регенеративних можливостей МСК тимуса та оформлення дисертаційної роботи. Вони не носять принципового характеру і не знижують її наукового та практичного значення.

**Висновок**

Дисертаційна робота Нікольської Катерини Ігорівни «Стимуляція регенерації імунної системи опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин і прогеніторів, преінкубованих з мультипотентними стромальними клітинами тимуса» є самостійною завершеною науковою працею, в якій отримано нові науково обґрунтовані результати, які дозволяють вирішити актуальну задачу сучасної імунології та імунотерапії – підвищити ефективність регенерації імунної системи внаслідок

трансплантації МСК тимуса та преінкубованих з МСК тимуса ГСК.

Дисертаційна робота відповідає вимогам п.11-13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року №567 (зі змінами) щодо кандидатських дисертацій, а її автор – Нікольська Катерина Ігорівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.03.08 – імунологія та алергологія.

**Офіційний опонент:**

Завідувач кафедри клінічної імунології  
та алергології з секцією медичної  
генетики НМУ імені О.О.Богомольця  
доктор медичних наук, професор

Курченко А.І.

