

ВІДЗИВ

дисертаційної роботи М.Д. Кучми "Порівняльна характеристика гемопоетичних стовбурових/прогеніторних клітин плаценти, пуповинної крові та фетальної печінки людини", представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Для відновлення гемопоезу в клініках багатьох країн світу найбільш широко використовується трансплантація алогенних HLA-ідентичних поліпотентних гемопоетичних стовбурових клітин (ПГСК) кісткового мозку. На жаль, цей метод з ряду причин і в теперішній час (за виключенням трансплантації гаплоідентичного кісткового мозку і аутологічних ПГСК при проведенні високодозової хіміотерапії) не виконується в Україні.

Безумовно, на увагу заслуговують нечисленні різнопланові дослідження, скеровані на вирішення цієї проблеми.

Робота М.Д. Кучми присвячена актуальній проблемі сучасної біології і медицини – пошуку альтернативних джерел ПГСК і кровотворних клітин-попередників, вкрай необхідних для трансплантації при апластичній анемії, онкогематологічних захворюваннях і вроджених імунодефіцитних станах.

Основною метою дисертанта було вдосконалення біотехнологічних методів виділення ПГСК і кровотворних клітин-попередників з ембріональної печінки, пуповинної крові та плаценти людини і порівняльне дослідження їх імунофенотипу із застосуванням панелі моноклональних антитіл.

Перші два джерела отримання ембріональних кровотворних клітин для трансплантації досить знайомі. В той же час нові дані про гемопоез у плаценті і вміст в цьому органі стовбурових гемопоетичних клітин і кровотворних клітин-попередників з'явилися тільки кілька років тому.

Отже, перед автором постали складні завдання – розробити спосіб виділення ПГСК із тканини кріоконсервованої плаценти, вивчити цитоморфологічні ознаки кровотворних клітин, що з'являються на ранніх стадіях гемопоезу, вивчити експресію на їх поверхневих мембранах лінійно-

специфічних маркерів і антигенів, властивих клітинам на різних стадіях диференціювання.

Дисертаційна робота, яка викладена на 129 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, огляду доступної літератури і 4 розділів, в яких представлені матеріали і методи, результати власних досліджень автора, їх узагальнення і аналіз. Роботу ілюстровано 26 рисунками і 2 таблицями. Список цитованої літератури охоплює 164 джерела, авторами яких є переважно іноземні дослідники. Зауважимо, що в ньому мали б знайти належне місце і монографії вітчизняних авторів, присвячені вивченню стовбурових клітин (Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сірман В.М., 2004; Запорожан В.Н., Бажора Ю.І., 2004; Петренко О.Ю., та ін., 2011).

У Вступі досить чітко підкреслено актуальність обраної теми для вирішення нагальних питань трансплантації ПГСК, виділених з ембріональної печінки, крові судин пуповини і плаценти з метою ефективного лікування хворих на апластичні стани кровотворення, гемобластози і прояви вродженого імунодефіциту. Визначені переваги і недоліки використання ПГСК і кровотворних клітин з вище зазначених джерел з урахуванням кількості необхідних клітин і тривалості часу відновлення гемопоезу, вірогідністю приживлення пересаджених клітин і розвитку реакції “трансплантат проти хазяїна”. Підкреслена важливість вивчення цитоморфологічних та імунофенотипових характеристик ПГСК, виділених з різних джерел та їх здатності до диференціювання.

Саме ці питання були покладені в основу дисертаційної роботи, виконаної М.Д. Кучмою.

В розділі 1 (Огляд літератури), який чомусь не має назви, представлені дані стосовно імунофенотипових ознак ПГСК плаценти людини, стовбурових клітин, виділених з пуповинної крові та ембріональної печінки. Ці дані були отримані з використанням імунофлюоресцентної мікроскопії і мультипараметричної протокової цитометрії. Починається розділ з

представлення сучасної схеми диференціювання клітин кровотворної системи людини, опублікованої в 2012р. групою дослідників з Канади, очолюваної J.E. Dick. Вона включає нові дані про ГСК, про їх найближчих нащадків — мультипотентних клітин-попередників, загальних попередників мієлопоезу і лімфопоезу і т.і. Нам здається, у порівняльному плані було б бажаним навести оригінальну вітчизняну схему гемопоезу І.Л. Черткова і А.І. Вороб'йова, в якій наведені також відомості про ПГСК і кровотворні клітини-попередники, які виявляються в жовточному мішку і печінці в ембріональному періоді.

Цінним в огляді доступної літератури є те, що основні гістогенетичні маркери ПГСК і клітин-попередників (антигени CD34, CD38, CD90, CD133) розглядаються з урахуванням терміну гестації. Підкреслюється, що недостатньо вивченими лишаються питання стосовно морфологічних особливостей ПГСК.

Серед примітивних ПГСК пуповинної крові більшість представлені мононуклеарними клітинами невеликих розмірів з імунофенотипом CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺, HLA-DR⁻. Кровотворні CD34⁺CD117⁺ клітини-попередники в ембріональній печінці характеризуються високим рівнем експресії антигену CD38, проте, на відмінність від ПГСК, мають обмежений проліферативний потенціал.

При аналізі даних доступної літератури було встановлено, що залишаються майже невивченими ПГСК зрілої плаценти. Відсутні дані про морфологію цих клітин. Панель мкАт, яка була використана для їх фенотипування, є вкрай обмеженою (CD34, CD45, CD38), не завжди уточнювався термін гестації.

Виходячи з вище зазначеного, дослідження імуноцитохімічних і функціональних особливостей ПГСК, виділених з різних джерел, було визнано актуальним для сучасної біотехнології і трансплантології і покладено в основу виконання даної дисертаційної роботи.

Для вирішення поставлених завдань автором були вивчені клітини, виділені з 17 зразків плаценти, з 7 зразків ембріональної печінки і 149 - пуповинної крові.

Методи виділення фракцій ядровмісних кровотворних клітин, культивування їх у напівтвердих культуральних середовищах, визначення імунофенотипу за допомогою проточної цитофлюориметрії і панелі кон'югованих з флюорохромами мкАт представлені в розділі 2 "Матеріали і методи досліджень".

В розділі 3 наведені дані про отримання стовбурових клітин і гемопоетичних клітин-попередників з різних джерел та їх імунофенотипову характеристику.

До елементів наукової новизни належать наступні. Автором вперше було встановлено, що ГСК плаценти містять достовірно вищий відсоток міелоїдних та еритроїдних комітованих кровотворних клітин-попередників у порівнянні з клітинами пуповинної крові та достовірно вищу кількість відповідних клітин-попередників у порівнянні з ГСК ембріональної печінки. Для них властивий більш високий рівень експресії антигена CD90 і наявність субпопуляції з високою експресією CD31.

Дисертантом вперше серед вітчизняних дослідників підтверджений факт активного гемопоезу в зрілій плаценті людини.

В ході виконання роботи розроблено нові біотехнологічні підходи (модифіковано методи виділення ПГСК з тканини плаценти, що сприяють збереженню їх функціональних властивостей, адаптовано методи проточної цитофлюориметрії для ідентифікації ПГСК у зразках кріоконсервованої тканини плаценти і т.і.).

Наведені в дисертаційній роботі результати отримані здобувачем особисто або за її безпосередньої участі. Матеріали дослідження, виконаного в рамках наукових тем відділу генетики людини Інституту молекулярної

біології та генетики НАН України, широко представлені на Міжнародних наукових форумах, опубліковані в 7 наукових статтях у фахових виданнях.

Шість висновків, які закономірно витікають з результатів виконаного дослідження, свідчать про безумовну перспективність використання ПГСК, виділених з плаценти пуповинної крові та ембріональної печінки для терапії захворювань, в основі яких лежить порушення процесів гемопоезу.

На жаль, в рукопису дисертації не має розділу “Практичні рекомендації”. Бажано було б на основі отриманих результатів підготувати патент на корисну модель. На нашу думку, в назві дисертаційної роботи також краще було б використання терміну “Клітини-попередники” замість “прогеніторні клітини”. Ці дрібні зауваження не впливають на загальне позитивне враження від роботи.

Робота М.Д. Кучми присвячена актуальним питанням біотехнології отримання і використання для трансплантації з метою лікування порушень гемопоезу ПГСК в кровотворних клітин-попередників, виділених з плаценти, пуповинної крові та ембріональної печінки. Автором отримані нові наукові дані, які мають важливе практичне значення.

Дисертація М.Д. Кучми відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013р. № 567, а її автор М.Д. Кучма заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 — біотехнологія.

Завідувач відділу
імуноцитохімії та онкогематології
Інституту експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
доктор медичних наук професор

Д.Ф. Глузман

