

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора биологических наук, руководителя научно-исследовательского Центра клеточной и молекулярной патологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства на диссертационную работу **Лучкина Антона Владимировича** по теме: «Определение и динамическое исследование длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией на разных этапах течения болезни», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. – «Гематология и переливание крови».

Актуальность темы исследования

Современные протоколы комбинированной иммуносупрессивной терапии позволили достичь 60-90% длительную выживаемость у больных апластической анемией. Однако, остается группа рефрактерных больных к стандартному лечению, что определяет необходимость дальнейшего изучения патофизиологических механизмов развития рефрактерности болезни и разработки новых, более эффективных методов терапии. Другой проблемой является клональная эволюция в миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз и пароксизмальную ночную гемоглобинурию, что также требует лучшего понимания причин развития и различий течения болезни.

За последнее десятилетие в нескольких крупных исследованиях выделен ряд факторов, позволяющих прогнозировать ответ на ИСТ: интервал «установление диагноза – начало терапии», абсолютное количество нейтрофильных форм лейкоцитов, ретикулоцитов, наличие клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии, хромосомных aberrаций и некоторые другие. В то же время, накопленных данных недостаточно для достоверного прогнозирования результатов лечения, что требует выделения новых «маркеров» рефрактерности к терапии.

Укорочение длины теломер, рассматривается как один из механизмов

развития рефрактерности к иммуносупрессивной терапии. Помимо плохого ответа на лечение, короткие теломеры у больных апластической анемией коррелируют с высокой частотой клональных осложнений, в том числе с трансформацией в миелодиспластический синдром.

На сегодняшний день существует несколько методик определения длины теломер, однако многие из них имеют существенные недостатки для применения в реальной практике: трудоемкость, отсутствие стандартизованных протоколов, использование радиоактивных меток и прочие, что ограничивает ученых в сопоставлении полученных данных с результатами других исследований. Flow-FISH (сочетание проточной цитометрии и флуоресцентной гибридизации *in situ*) позволяет достичь чувствительности в 100%, а специфичности в 93%. В его основе лежит связывание теломерной последовательности «TTAGGG» с пептидной нуклеиновой кислотой (PNA; peptid nucleic acid), флуоресцентно меченной «СССТАА», с дальнейшим цитофлуориметрическим исследованием и анализом полученных данных. Основной проблемой методики остается невозможность получения данных в абсолютных величинах. С целью точного перевода относительной длины теломер в абсолютную необходимо сопоставление двух методов, например, flow-FISH и ПЦР.

Таким образом, использование современных методов измерения длины теломер у больных апластической анемией имеет как прикладное значение, а именно выделение группы больных с плохим прогнозом ответа на иммуносупрессивную терапию, высоким риском клональных осложнений, так и позволяет изучить механизмы развития внутренних дефектов стволовых клеток и внести вклад в понимание патогенеза апластической анемии.

Учитывая вышеизложенное, диссертационная работа Лучкина А.В, посвященная изучению длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией, является актуальной и своевременной.

Научная новизна

Данная диссертационная работа посвящена изучению длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией. Научная новизна заключается в исследовании длины теломер не только до начала лечения, но и ее изменений в процессе иммуносупрессивной терапии. На собственной выборке пациентов было выполнено сравнение полученных данных с данными здоровых добровольцев и больных врожденным дискератозом.

Отдельного внимания заслуживает разработка методики определения абсолютной длины теломер на основе сопоставления flow-FISH и ПЦР в реальном времени. Получена возможность определения абсолютных значений длины теломер при помощи методики проточной цитометрии, что позволяет использовать полученные данные в сравнении результатов других исследований. Методика была запатентована.

Ценность для науки и практики

Практическая значимость диссертационной работы заключается в сравнении длины теломер мононуклеаров крови и костного мозга, а также длины теломер в разных клеточных популяциях, что позволило определить оптимальный материал для выполнения исследования у больных апластической анемией.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что длина теломер может быть использована для проведения дифференциальной диагностики между идиопатической апластической анемией и врожденным дискератозом у взрослых пациентов.

По результату многофакторного анализа были определены факторы, влияющие на достижение гематологического улучшения, ремиссии заболевания, а также на частоту развития клональных осложнений. Одними из таких факторов являются относительная и абсолютная длина теломер.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

В диссертационной работе цель и задачи носят конкретный характер, обоснованы, понятны. Для статистической обработки материалов, методов и анализа результатов использованы современные компьютерные программы, статистический анализ выполнен в полном объеме. Достоверность результатов обеспечена объемом выполненных исследований с использованием современных лабораторных методик. Все основные научные положения, выводы четко и подробно аргументированы, достоверны.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 7 работ в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 15 тезисных сообщений, в том числе 7 – в англоязычных сборниках конференций. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на различных научных конференциях и «VI конгрессе гематологов России».

Оценка содержания работы

Диссертация Лучкина А.В. посвящена изучению изменения длины теломер у больных апластической анемией, построена по традиционному плану, изложена на 110 страницах машинописного текста. Работа иллюстрирована 22 рисунками, 18 таблицами. Список литературы содержит ссылки на 98 литературных источников, из которых 10 отечественных авторов.

Во введении отображена необходимость и актуальность изучаемой проблемы, ее новизна, теоретическая и практическая ценность работы.

Глава обзор литературы представлена на 26 страницах. Подробно изложен анализ данных отечественной и иностранной литературы по вопросам патогенеза апластической анемии, основных методов лечения. Каждый раздел обзора литературы соответствует этапам диссертационной работы. В начале обзора изложены функции, строение и основные механизмы нестабильности теломерных

повторов ДНК. Далее приведены литературные данные, посвященные исследованиям роли длины теломер при апластической анемии и при других гематологических заболеваниях. Отдельно уделено внимание описанию современных, используемых при исследовании теломер, методик. Литературный обзор подробный, полный и позволяет автору убедительно обосновать научную и практическую значимость проведенного исследования.

Раздел, посвященный описанию материалов и методов, четко и подробно изложен на 24 страницах. Приведена характеристика включенных групп больных и доноров, иллюстрирован дизайн исследования.

Подробно описаны основные методики определения длины теломер, которые использовались в исследовании, включающие протоколы работы с клеточными культурами, определения относительной длины теломер и абсолютной длины теломер методом flow-FISH. Отдельного внимания заслуживает методика сопоставления ПЦР в реальном времени и flow-FISH с целью достоверного определения абсолютной длины теломер.

Обработка полученных результатов выполнена с использованием стандартных методов статистического анализа.

В результатах работы первым этапом описано сравнение мононуклеаров крови и костного мозга с целью выбора наиболее подходящего материала для анализа длины теломер. Также проведен анализ в различных клеточных популяциях (мононуклеарах, лимфоцитах, моноцитах) периферической крови и костного мозга, что является уникальным для выборки больных апластической анемией. При этом не получено значимых различий.

Интересно, что длина теломер была меньше при длительном анамнезе болезни до начала лечения, что может быть объяснено длительным периодом стрессового кроветворения в условиях сниженного пула гемопоэтических стволовых клеток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что длина теломер является одним из маркеров ответа на иммуносупрессивную терапию и может

использоваться при определении прогноза ответа на лечение в совокупности с другими традиционными факторами.

Представляют научную ценность и данные о исследовании длины теломер в процессе проведения лечения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что средняя длина теломер мононуклеаров крови не изменялась в течении двух лет наблюдения. При этом, отдельно описаны случаи уменьшения длины теломер по мере появления новых патологических клонов, в том числе и моносомии 7. Причина данного феномена остается предметом дальнейших исследований.

Дополнительно была проанализированы больные, рефрактерные к комбинированной иммуносупрессивной терапии. В это группе длина теломер была значимо меньше, что можно объяснить продолжительным периодом дефектного кроветворения без ответа на лечение и критическим изнашиванием теломер. С другой стороны, именно больные с исходно короткими теломерами могли с большей долей вероятности в последующем не достичь ответа на лечение.

В главе «Обсуждение» подробно сопоставлены собственные результаты в сравнении с данными отечественных и зарубежных исследователей. Были обсуждены полученные данные о выборе наиболее подходящего материала для исследования длины теломер у больных с костномозговой недостаточностью. Приведено сравнение длины теломер как фактора прогноза ответа на лечение между разными исследовательскими группами. Проанализирован характер изменения длины теломер в процессе лечения.

Данная работа имеет перспективное будущее для дальнейших исследований.

Недостатки по содержанию и оформлению работы

Работа выполнена на высоком методическом и профессиональном уровне. Существенных замечаний по смыслу выполненного исследования и содержанию, выбору методических подходов, обоснованности положений и выводов, практической и теоретической значимости нет.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным
Положением о порядке присуждении ученых степеней**

Диссертационная работа Лучкина Антона Владимировича на тему: «Определение и динамическое исследование длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией на разных этапах течения болезни», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Михайловой Елены Алексеевны и доктора медицинских наук Гальцевой Ирины Владимировны, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной самостоятельно выполненной квалификационной научной работой, в которой проведено исследование абсолютной и относительной длины теломер на разных этапах лечения больных апластической анемией: до начала и в процессе иммуносупрессивной терапии. Выявлена достоверная значимость укорочения длины теломер при оценке ответа на лечение, определены лабораторные факторы неблагоприятного прогноза. Принципиальных замечаний к оформлению, смыслу и выводам диссертационной работы нет.

Таким образом, диссертация Лучкина Антона Владимировича по своей актуальности, уровню проведенных исследований, научной и практической ценности полученных результатов полностью соответствует пунктам 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842 (с изменениями и дополнениями в редакции от 18 марта 2023 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. – Гематология и переливание крови.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (шифр 3.1.28. – Гематология и переливание крови), руководитель научно-исследовательским Центром клеточной и молекулярной патологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский

научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии»
Федерального медико-биологического агентства России.

Мартынкевич Ирина Степановна

Подпись д.б.н., Мартынкевич И.С. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России,

Доктор медицинских наук



Павлова Ирина Евгеньевна

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства России

Адрес: 191024, Санкт-Петербург, ул.2-я Советская, д.16

E-mail: genetics.spb@mail.ru

Тел: +7(812) 925-05-62

Дата: «18» августа 2023 г.