

## ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора медицинских наук, профессора, заместителя генерального директора – директора Управления по научно-аналитической работе с регионами Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации **Сметаниной Наталии Сергеевны** 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

Комбинированная иммуносупрессивная терапия является одним из основных подходов в терапии больных идиопатической апластической анемией. Однако, несмотря на постоянную разработку новых схем лечения и применение современных лекарственных препаратов, проблема рефрактерности к проводимой терапии и развития клональной эволюции с трансформацией в миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз и пароксизмальную ночную гемоглобинурию в настоящий момент остаётся актуальной. Важную роль в лечении больных занимает и выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), своевременное её проведение позволяет увеличить выживаемость больных апластической анемией.

Механизмы, запускающие активацию иммунной системы при апластической анемии продолжают изучаться. Каскад реакций, обуславливающих развитие аутоагрессии против собственных гемопоэтических стволовых клеток, тесно связан с внутриклеточными дефектами. Изучение иммунологических процессов, а также механизмов развития внутренних дефектов гемопоэтических стволовых клеток остается актуальным направлением изучения патогенеза апластической анемии. Особую ценность имеет выделение дополнительных факторов риска неудачи иммуносупрессивной терапии, что позволяет в короткие сроки перейти к выбору альтернативного лечения, в том числе выполнить алло-ТГСК.

Теломерные районы ДНК отвечают за сохранение целостности генетического материала клетки. Дефекты теломеразного комплекса могут рассматриваться фактор риска повреждения хромосом, ведущего к возникновению хромосомных aberrаций, и, как следствие, активации апоптоза клеток предшественников и появлению опухолевых клонов. Роль значительного укорочения длины теломер доказана при развитии врожденного дискератоza, одной из форм

конституциональных апластических анемий. При этом определяются те или иные дефекты системы поддержания стабильности теломер, что ведет к развитию костномозговой недостаточности и повышенной частоте развития гематологических и солидных неоплазий. Часть пациентов, страдающих идиопатической апластической анемией, развивают клональные осложнения по мере течения болезни, в связи с чем представляет интерес изучение длины теломер как в дебюте заболевания, так и её изменения в динамике, что может помочь расширить представление о патогенезе заболевания и клональной эволюции.

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

### **Научная новизна**

В данной диссертационной работе проведено исследование длины теломерных районов ДНК у здоровых доноров, больных врожденным дискратозом и больных апластической анемией. Исследование впервые проведено не только в дебюте заболевания, но и на разных этапах течения болезни.

Разработан собственный подход определения абсолютной длины теломерных районов ДНК на основе сопоставления современных лабораторных методик – flow-FISH и ПЦР в реальном времени, сформирована группа здоровых доноров различного возраста с целью получения референсных значений относительной и абсолютной длины теломер, проведено сопоставление полученных результатов и разработана формула перевода относительных величин в абсолютные, что позволяет проводить сравнение между собой результатов различных исследований. Диссертантом совместно с исследовательской группой был получен патент на изобретение «Способ определения абсолютной длины теломер лейкоцитов с помощью метода проточной цитометрии».

Впервые выполнено сравнение длины теломер мононуклеаров крови и костного мозга, а также их фракций (моноцитов, лимфоцитов) у больных апластической анемией в дебюте заболевания. Было изучено изменение длины теломер в процессе проведения иммуносупрессивной терапии, в том числе при появлении новых хромосомных aberrаций. Кроме того, проведен анализ длины теломер у здоровых доноров и больных врожденным дискратозом, сопоставлены результаты измерения в различных группах испытуемых. Как и у здоровых добровольцев, показано отсутствие изменения длины теломер у больных апластической анемией за период наблюдения в процессе лечения. Также не были обнаружены изменения данного параметра в динамике в группах больных с исходно более короткими и более

длинными теломерами. Обнаружена тенденция к более частому возникновению новых хромосомных aberrаций у больных апластической анемией с более короткими теломерами.

Данный научный труд посвящен влиянию различных факторов риска на лечение больных апластической анемией.

### **Ценность для науки и практики**

Основная практическая значимость диссертационной работы заключается в определении дополнительных факторов прогноза ответа на иммуносупрессивную терапию у больных идиопатической апластической анемией, в частности относительной и абсолютной длины теломерных районов ДНК, позволяющих персонафицировать терапевтический подход в каждом конкретном случае.

Полученные данные позволяют использовать данный маркер с целью дифференциальной диагностики врожденного дискератоза и идиопатической апластической анемии.

Определен наиболее подходящий диагностический материал для исследования длины теломер у больных апластической анемией (мононуклеары периферической крови).

Теоретическая значимость полученных результатов состоит в том, что исследование изменения длины теломер у каждого конкретного больного может позволить определить наличие внутренних дефектов гемопоэтических стволовых клеток и расширить понимание механизмов клональной эволюции при апластической анемии.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

В диссертационной работе цель и задачи носят конкретный характер, обоснованы, понятны. Для статистической обработки материалов и 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 Российской Федерации, 15 тезисных сообщений, в том числе

7 – в англоязычных сборниках конференций. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на различных научных конференциях и «V конгрессе гематологов России».

### **Оценка содержания работы**

Диссертация Лучкина А.В. посвящена изучению изменения длины теломер в различных клетках 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 автор научной работы достаточно убедительно доказывает необходимость и актуальность изучаемой проблемы, ее новизну, теоретическую и практическую значимость.

Глава обзор литературы представлена на 26 страницах, на которых изложен подробный обзор строения теломеразного комплекса, функции теломер, возможных механизмов их повреждения и системы репарации. Представлен анализ данных отечественной и иностранной литературы по вопросам изучения длины теломер при различных нозологиях и, в частности, особое внимание уделено апластической анемии. Отдельный раздел обзора литературы посвящен влиянию изменения длины теломер на эффективность лечения апластической анемии. В последнем разделе обзора представлены современные методы определения длины теломер, два из которых были применены в данной диссертационной работе.

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. Полнота описания свидетельствует об освоении соискателем современных высокотехнологичных лабораторных методик, в частности, мультицветной проточной цитометрии, на уровне специалиста. Диссертантом совместно с исследовательской группой была разработана и запатентована 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.

Полученные результаты измерения относительной и абсолютной длины теломер здоровых доноров различного возраста сопоставимы с таковыми в других научных исследованиях. Была подтверждена значимая обратная корреляция между длиной теломер и возрастом здорового контроля.

В результатах исследования подробно описаны сравнения относительной и абсолютной длины теломер в мононуклеарах, лимфоцитах, моноцитах периферической крови и костного мозга, при этом не получено значимых различий. Был сделан вывод о том, что наиболее подходящим для исследования материалом с учетом технологии получения являются мононуклеары периферической крови. Полученный на различных сроках лечения одного больного биоматериал исследовался одновременно с применением технологии криоконсервирования, что позволило выполнить исследование сразу на всех точках.

Немаловажным является исключительно проспективный характер выполненной диссертационной работы, получено достаточно материала для достоверных исследований, несмотря на орфанный характер изучаемой нозологии.

В диссертационной работе проведено сравнение относительной длины теломер у больных апластической анемией и врожденным дискератозом. На собственной когорте больных показано, что ультракороткие теломеры не характерны для идиопатической апластической анемии, что может быть важно при проведении дифференциальной диагностики во взрослом возрасте.

Показано отсутствие различий длины теломер при нетяжелой и тяжелой форме апластической анемии. Одним из важных практических моментов диссертационной работы является выявленное статистически значимое уменьшение длины теломер при длительности заболевания более 6 месяцев до начала иммуносупрессивной терапии.

С использованием многофакторного и однофакторного анализа определены факторы риска, влияющие на частоту достижения ответа на лечение. Наряду с традиционными факторами прогноза, такими как тяжесть и длительность заболевания, длина теломер при первичной диагностике достоверно влияла на вероятность достижения ремиссии заболевания. Показано, что частота достижения частичной и полной ремиссии в группе больных с более длинными теломерами была достоверно выше. Таким образом, короткая длина теломер при первичной диагностике может быть использована в реальной клинической практике как один из предикторов плохого ответа на иммуносупрессивную терапию, что в свою очередь может послужить стимулом к раннему выполнению алло-ТГСК.

Также укорочение теломер было ассоциировано с большей частотой появления новых хромосомных aberrаций, хотя различия были достоверно незначимыми ввиду малого числа событий.

В диссертационной работе проведено динамическое исследование изменения длины теломер. Особый интерес представляет раздел, описывающий изменение длины теломер до лечения и в процессе терапии в контрольные сроки на +3, +6, +12 и +24 месяц от проведения первого курса антитимоцитарного глобулина. По результатам проведенного анализа показано отсутствие достоверно значимых изменений длины теломер в процессе лечения больных

апластической анемией, что представляется важным в понимании патогенеза заболевания. По мере выявления новых хромосомных aberrаций отмечалось дополнительное уменьшение длины теломер на 10 и более процентов. Отдельного внимания заслуживает описание клинического случая укорочения теломер у больного по мере обнаружения моносомии 7 и восстановления длины теломер после спонтанной элиминации патологического клона.

В главе «Обсуждение» подробно сопоставлены собственные результаты в сравнении с данными отечественных и зарубежных исследователей. Исследование длины теломер позволяет проводить более детальную дифференциальную диагностику и спрогнозировать вероятность ответа на иммуносупрессивную терапию у больных апластической анемией, выделить группу заведомо потенциально рефрактерных больных, для которых особо необходим персонализированный подход к лечению.

Таким образом, 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 присуждения 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 медицинских наук (шифр 3.1.28. – Гематология и переливание крови), профессор, заместитель генерального директора – директор Управления по научно-аналитической работе с регионами Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Сметанина Наталия Сергеевна**

**Подпись д.м.н., профессора Сметаниной Н.С. заверяю:**

Главный ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»  
Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор



**Спиридонова Елена Александровна**

**Сведения об организации:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

117997, г. Москва, ул. Самора-Машела, д.1

Тел.: +7-(495)-664-70-11, +7-(495)-287-65-88. Email: [info@fnkc.ru](mailto:info@fnkc.ru)

Сайт: <https://fnkc.ru/>

Дата: «30» августа 2023 г.