

## ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора биологических наук, доцента, ведущего научного сотрудника лаборатории клеточной физиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук **Андреевой Елены Ромуальдовны** на диссертацию **Дорофеевой Алены Игоревны** «Стромальные предшественники из костного мозга при апластической анемии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови.

### Актуальность темы диссертации

Снижение количества и нарушение функционирования кроветворной стволовой клетки у больных апластической анемией приводит к развитию аплазии костного мозга и панцитопении, тяжесть которой различается в зависимости от формы заболевания. Удовлетворительный результат применения иммуносупрессивной терапии подтверждает аутоиммунную природу заболевания у большинства больных. Однако рефрактерное течение, рецидив и/или отсутствие полного ответа у некоторых больных указывают на существование пока неизвестных факторов, вовлеченных в развитие аплазии при апластической анемии. Выявление этих факторов необходимо для разработки дополнительных подходов, повышающих эффективность стандартных методов лечения.

Функционирование стволовой кроветворной клетки происходит в нише костного мозга. Ниша включает несколько типов клеток, а также синтезируемых ими сигнальных молекул и межклеточного матрикса. Одним из основных компонентов ниши являются мезенхимные стволовые клетки (МСК). Они расположены в непосредственной близости к кроветворным стволовым клеткам и осуществляют поддержание их свойств. Потомки МСК (более поздние стромальные предшественники) в результате пролиферации и дифференцировки образуют все клетки стромы костного мозга. *In vitro* выделяют два типа стромальных предшественников – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) и колониобразующие единицы фибробластов (КОЕф). ММСК из

костного мозга здорового человека хорошо изучены. Они обладают высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом, а также способностью к поддержанию гемопоэтических предшественников и к иммуносупрессии. Нарушение функциональных свойств ММСК связано с развитием некоторых патологических состояний, таких как острый миелоидный лейкоз, хронический миелолейкоз, миелодиспластический синдром, множественная миелома и другие. Свойства КОЕф изучены недостаточно.

В современной литературе представлены исследования, посвященные изучению стромальных предшественников из костного мозга при апластической анемии, однако, до сих пор не определена их роль в патогенезе данного заболевания, поскольку полученные результаты не согласуются между собой. Это связано с низкой частотой встречаемости апластической анемии, при которой формирование репрезентативной выборки больных представляется непростой задачей. Кроме того, в отличие от здоровых доноров получить стромальные предшественники из костного мозга при апластической анемии удастся не во всех случаях. В связи с этим большинство исследований выполнено на небольшом числе образцов от больных с разной тяжестью и на разных этапах заболевания, что затрудняет интерпретацию результатов. Поэтому изучение свойств стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией в дебюте при разных формах заболевания на выборках достаточно большого размера для получения значимых различий между группами представляется актуальной задачей современной гематологии.

### **Научная новизна**

В диссертационной работе Дорофеевой Алены Игоревны впервые проанализированы два типа стромальных предшественников из костного мозга больных апластической анемией в дебюте в зависимости от тяжести заболевания. Изучение функциональных свойств мезенхимных клеток было выполнено с применением разнообразных методических подходов, позволяющих оценить способность стромальных предшественников к формированию полноценной кроветворной территории в организме больных.

Анализ профиля экспрессии панели генов, ассоциированных с пролиферацией, дифференцировкой, поддержанием кроветворения и иммуномодуляцией, выполнен на образцах ММСК и КОЕф, полученных от индивидуальных больных, при этом выявлены достоверные различия по сравнению с донорами, а также между формами заболевания. Подобных исследований в литературе не описано. Ранее изучение транскрипции генов проводили только на объединенных образцах ММСК больных и доноров, что не позволяло сделать вывода о значимости полученных различий.

Результаты анализа экспрессии генов в ММСК и КОЕф указывают на различия между формами апластической анемии на уровне стромальных предшественников из костного мозга.

### **Ценность для науки и практики**

В работе проведено сравнение двух типов стромальных предшественников из костного мозга здоровых доноров. Показано, что по сравнению с ММСК КОЕф характеризуются повышенным уровнем экспрессии генов, ассоциированных с поддержанием кроветворения и иммуномодуляцией, что указывает на их роль в регуляции гемопоеза и иммунного ответа. Результаты данного исследования расширяют представления современной науки о функционировании стромального микроокружения костного мозга.

Показаны различия в свойствах стромальных предшественников из костного мозга при нетяжелой, тяжелой и свертяжелой апластической анемии, что имеет важное значение для понимания механизма развития аплазии при разных формах заболевания. Кроме того, это указывает на возможность создания дополнительных терапевтических подходов, повышающих эффективность стандартных методов лечения у больных с разной степенью тяжести апластической анемии.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Обоснованность выводов диссертационной работы не вызывает сомнений. Она основана на тщательной проработке дизайна эксперимента, применении современных методов клеточной и молекулярной биологии, широко используемых

в мировом научном сообществе. Результаты получены на выборках достаточно большого размера для такого редкого заболевания, как апластическая анемия, и позволяющих получить достоверные различия между группами. Анализ данных проведен согласно методикам, описанным в литературе. Статистическая обработка выполнена в полном объеме с использованием специального программного обеспечения. Результаты анализа функциональных свойств стромальных предшественников согласуются между собой и подтверждаются молекулярно-биологическими данными.

### **Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати**

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Российской Федерации, и 11 тезисных сообщений.

### **Структура и оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа построена по стандартному плану и оформлена в соответствии с ГОСТ Р 7.0.100 – 2018. Она состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, четырех приложений. Работа изложена на 141 странице машинописного текста и содержит 18 рисунков и 8 таблиц.

Работа выполнена на высоком методическом и профессиональном уровне, написана академичным и понятным языком, характеризуется целостностью и логичностью построения.

Во введении автор раскрывает актуальность и степень разработанности темы, обосновывает новизну, теоретическую и практическую значимость работы, формулирует цели и задачи исследования.

В первой главе диссертации проведен подробный обзор литературы, в котором описано устройство кроветворной ниши, свойства стромальных предшественников, современные представления о диагностике, терапии, патогенезе апластической анемии, а также систематизированы результаты исследований мезенхимных клеток из костного мозга при данном заболевании.

Глава «Материалы и методы» включает характеристику групп больных и доноров, а также описание методов выделения, анализа стромальных предшественников из костного мозга и методы статистической обработки данных.

Результаты и обсуждение объединены в одной главе, содержат собственные данные и их взаимосвязь с мировыми исследованиями. Показано, что эффективность получения культур ММСК и КОЕф у больных апластической анемией снижена по сравнению с донорами. При этом анализ функциональных свойств данных клеток подтвердил их способность к образованию полноценного кроветворного микроокружения. Выявлены различия в экспрессии генов в двух типах стромальных предшественников при нетяжелой, тяжелой и сверхтяжелой апластической анемии, что указывает на отличия в механизмах развития аплазии при данных формах заболевания. Подавление экспрессии генов, ассоциированных с иммуносупрессией, в КОЕф больных тяжелой и сверхтяжелой апластической анемией свидетельствует о снижении способности к поддержанию иммунологической толерантности стволовой кроветворной клетки в костном мозге и может быть связано с развитием более выраженной аплазии при данных формах заболевания. Выявлены различия в профиле экспрессии генов, ассоциированных с регуляцией кроветворения, в стромальных предшественниках в зависимости от формы заболевания. Изменения в КОЕф больных нетяжелой формой, возможно, носят компенсаторный характер и направлены на поддержание большего числа гемопоэтических предшественников в нише, а при тяжелой и сверхтяжелой форме могут приводить к их мобилизации и утрате из костного мозга.

Представленные данные и их обсуждение логично приводят к заключению и пяти выводам, сделанным в результате работы.

Все использованные сокращения приведены списком в конце текста.

Список литературы включает 253 источника, из них 239 зарубежных и 14 отечественных.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационного исследования.

При ознакомлении с работой возникли некоторые вопросы и замечания.

1. В работе детально охарактеризованы профили транскрипции генов ММСК и КОЕ-ф. Насколько эти данные могут быть использованы для интерпретации изменения активности кодируемых молекул? Например: «Сравнение ОУЭ генов, ассоциированных с иммуномодуляцией, в двух типах стромальных предшественников показало повышенный ОУЭ ИДО-1, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10, CD274 и HLA-DRA в КОЕф, что указывает на более выраженную способность этих клеток к иммуносупрессии по сравнению с ММСК». Имеются ли у Вас или литературные данные об уровне кодируемых продуктов в популяциях ММСК и КОЕ-ф?

2. В литобзоре на стр. 14 сказано «...непосредственная регуляция функций СКК мегакариоцитами отражает наличие обратной связи от дифференцированных потомков к наиболее ранним гемопоэтическим предшественникам». Какие еще есть примеры подобной регуляции?

3. Что известно про иммуномодуляторную активность стромальных предшественников из КМ при АА?

4. В работе показано, что транскрипция иммуномодуляторных генов выше в КОЕ-ф по сравнению с ММСК. Какое это может иметь патофизиологическое значение?

Рукопись значительно бы выиграла, если бы в нее были включены схемы. В литобзор, например, схема иерархии стромального дифферона, в заключение – схема, обобщающая полученные результаты.

Сделанные замечания и вопросы носят частный характер не умаляют достоинств работы, которая, безусловно, заслуживает высокой оценки.

### **Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным**

#### **Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Диссертационная работа Дорофеевой Алены Игоревны «Стромальные предшественники из костного мозга при апластической анемии», выполненная под руководством доктора биологических наук Шипуновой Ирины Николаевны, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченным трудом, в котором на основании выполненных автором

исследований и разработок осуществлено решение важной для гематологии научной проблемы – выявлены различия между формами апластической анемии на уровне стромальных предшественников из костного мозга.

По своей актуальности, научной новизне, объему, методическому уровню и обоснованности выводов представленная диссертационная работа Дорофеевой Алены Игоревны полностью соответствует пунктам 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями и дополнениями в редакции от 25 января 2024 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.28. – Гематология и переливание крови.

**Официальный оппонент:**

ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем» Российской академии наук,

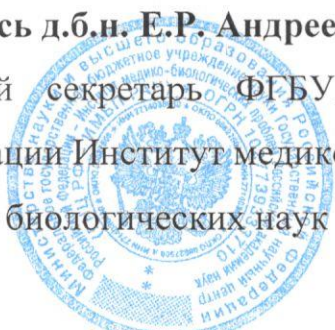
доктор биологических наук, доцент

Елена Ромуальдовна Андреева

«16» февраля 2024 г.

**Подпись д.б.н. Е.Р. Андреевой заверяю**

Ученый секретарь ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем» Российской академии наук, доктор биологических наук



Маргарита Александровна Левинских

**Сведения об организации:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
Институт медико-биологических проблем Российской академии наук  
123007, Российская Федерация, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76а,  
тел: +7 (499) 195-1500, +7 (499) 195-3020, e-mail: info@imbp.ru, https://www.imbp.ru/