

ОТЗЫВ

**официального оппонента
на диссертационную работу**

Шипуновой Ирины Николаевны «Иерархическая структура стромального микроокружения кроветворной ткани в норме и при заболеваниях системы крови», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Актуальность темы исследования

Кроветворная ниша – это высокоспециализированное многокомпонентное микроокружение, состоящее из клеток разных типов и разного происхождения, которое регулирует функции стволовых клеток крови. Известно, что существует взаимное влияние стромальных и кроветворных клеток. Сложность при анализе механизмов этого взаимодействия заключается в многоступенчатой иерархии прогениторных клеток взрослого организма. В настоящее время разными группами исследователей активно проводится изучение взаимодействия клеток в кроветворной нише в норме, в процессе развития заболеваний системы крови, а также в ходе их лечения. Однако оценка вклада более чем одного типа стромальных предшественников выполняются крайне редко. В связи с этим представленная диссертационная работа своевременно заполняет существующий пробел в данной области знаний. Изучение иерархической структуры стромальных клеток, механизмов их взаимодействия с гематопозитическими предшественниками, а также путей регуляции этого взаимодействия необходимо для полного представления о функционировании кроветворной системы. Актуальными и востребованными являются данные об изменениях, происходящих со стромальными предшественниками с возрастом, а также после курсов химиотерапевтических препаратов. Полученные данные могут помочь в разработке способов компенсации изменений, происходящих в кроветворной ткани с возрастом, под действием внешних воздействий или при развитии патологических процессов. Таким образом, работа Шипуновой И.Н., направленная на изучение функционирования стромальных предшественников в норме и изменений, происходящих при заболеваниях системы крови, является актуальной.

Научная новизна исследования

Автором было проведено исследование нескольких типов стромальных клеток-предшественниц в костном мозге мыши и человека в норме и при некоторых гематологических заболеваниях.

Прежде всего, несколькими функциональными методами было подтверждено взаимное расположение известных в настоящее время типов стромальных предшественников. В ходе исследований стромального микроокружения в здоровом костном мозге впервые было охарактеризовано действие двух системных регуляторов (паратиреоидного гормона и гидрокортизона) на некоторые типы стромальных предшественников. Влияние паратиреоидного гормона на кроветворные клетки было описано ранее, однако, анализ стромальных клеток-предшественниц в аспекте чувствительности к данному препарату был выполнен впервые. Влияние гидрокортизона на стромальные предшественники также было описано впервые в представленной работе, хотя этот фактор является обязательным, например, для поддержания кроветворения в длительных культурах костного мозга мыши. Однако, эффект гидрокортизона был охарактеризован только на одном типе предшественников, ММСК, роль которых в формировании кроветворной ниши до сих пор неоднозначна.

На большой выборке здоровых доноров проанализированы отличия стромальных предшественников в разных возрастных группах. Эту часть исследования отличает внушительный объем образцов костного мозга здоровых доноров, что делает эту часть работы уникальной, а результаты – безусловно достоверными.

Также впервые одновременно на двух типах стромальных предшественников в костном мозге мыши были исследованы изменения, вызываемые воздействием терапевтических доз цитостатических препаратов. Выявленные долгосрочные изменения были подтверждены автором в дальнейшем исследовании стромальных предшественников в костном мозге людей, перенесших высокодозную химиотерапию в ходе выполнения им трансплантации аллогенного костного мозга.

Исследование стромального микроокружения у пациентов с некоторыми гематологическими заболеваниями позволило установить не описанные ранее изменения. Так, автором впервые на большой выборке больных апластической

анемией на разных этапах течения заболевания, а также при различной тяжести этого заболевания были комплексно проанализированы изменения, происходящие со стромальными клетками. Впервые продемонстрирован феномен функциональной активации стромальных предшественников во время кроветворной аплазии в костном мозге. Несмотря на разнородность обследованных больных по тяжести заболевания и этапам лечения, большая величина выборки позволила сделать достоверные выводы, особенно учитывая невысокую частоту встречаемости данного заболевания. Безусловно уникальными являются данные об изменениях, происходящих со стромальными клетками разной степени зрелости до и после выполнения пациентам трансплантации аллогенного костного мозга. Важно, что состояние стромальных прогениторных клеток проанализировано у каждого пациента: до выполнения трансплантации, и на нескольких временных точках в течение года после нее. Такой подход представляется наиболее адекватным в применении к исследованиям длительных восстановительных процессов, так как позволяет учитывать индивидуальные особенности каждого пациента.

Обоснованность используемых методов

В работе задействован адекватный поставленным задачам широкий спектр современных методов клеточной и молекулярной биологии, а также использованы модельные системы для исследований *in vitro* и *in vivo*. Проведение экспериментов на мышах позволило решить ряд специальных задач представленной научной работы. Все экспериментальные серии сопровождалось адекватными контролями, поэтому обоснованность заключений не вызывает сомнения. Разработанные схемы экспериментов соответствуют требованиям биомедицинской этики

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Большие размеры проанализированных выборок пациентов и здоровых доноров, необходимые для получения статистически достоверных данных, привели к высокой достоверности полученных выводов. Она обеспечена также тщательной проработкой литературных данных по теме диссертации, детальной разработкой экспериментов, наличием в анализируемых группах большого количества

образцов, достаточного для достоверного использования выбранных методов статистического анализа. Наиболее важные заключения подтверждены данными, полученными с применением нескольких методических приемов.

Положения, вынесенные на защиту, обобщают экспериментальные данные, подтверждены глубоким анализом полученных результатов и носят фундаментальный характер.

Практическая значимость полученных результатов

Результаты исследования рекомендуется учитывать при планировании экспериментов и клинических исследований, включающих в себя стромальные клетки человека. Деление доноров по возрасту было проведено в соответствии с рекомендациями ООН. Таким образом, полученные данные стандартизованы, могут быть использованы в других отечественных или зарубежных исследованиях. Обнаруженные в разных группах доноров и пациентов изменения стромальных предшественников необходимо учитывать при проведении экспериментов и особенно клинических исследований. Подтвержденная иерархическая структура мезенхимных стромальных клеток костного мозга обеспечивает дальнейших исследователей необходимыми знаниями о функциях и потенциале каждого исследованного типа предшественников, что необходимо для правильного планирования экспериментов и адекватного анализа полученных данных.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по стандартному плану и состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы, списка сокращений и условных обозначений и приложений А, Б и В; содержит 274 страницы текста, 27 таблиц, 49 рисунков и список литературы из 447 источников. Работа написана хорошим литературным языком, отличается ясностью и логичностью изложения. Библиография содержит ссылки на 447 источников, из них 29 отечественных и 418 зарубежных.

Работа написана хорошим литературным языком, литературный обзор логично структурирован, рисунки и таблицы полно представляют полученные экспериментальные данные.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. По материалам диссертации опубликовано 20 статей, более половины которых входит в базу Web of Sciences.

При анализе диссертационной работы возникло несколько вопросов и замечаний:

- почему не сформулирован вывод о ММСК у больных апластической анемией после аллогенной трансплантации костного мозга?

- было бы интересно узнать мнение диссертанта о ранее выполненных работах российских ученых в данной области исследований (например, Зарицкого А.Ю., Ругаль В.И., Шацевой Т.А.

- в разделе 1.2. автор приводит фамилии многих исследователей, изучающих МСК, но почему-то не цитирует ни одной их статьи,

- жаль, что в заключении автор не попытался представить полученные результаты в виде схем, которые позволили бы более наглядно оценить вклад данной работы в имеющиеся в настоящий момент представления о роли стромальных предшественников в кроветворение в норме и при различных заболеваниях,

Среди незначительных замечаний можно отметить неполные подписи к рис. 25, неправильное цитирование ссылки [88] на стр.27 (ЦСА ингибирует апоптоз, вызванные не гипоксией, а реоксигенацией после гипоксии), опечатки на стр. 17, 24, 44, 51 и 121.

Высказанные замечания и вопросы носят частный характер и не умаляют высокой оценки диссертационной работы Шипуновой И.Н., которая не только вносит существенный вклад понимание физиологии и патологии кроветворения и предлагает новые подходы к оценке лечения гематологических заболеваний, но и ставит новые вопросы в этой области исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Шипуновой Ирины Николаевны «Иерархическая структура стромального микроокружения кроветворной ткани в норме и при заболеваниях системы крови» является оригинальным, самостоятельно выполненным, законченным научным трудом, который имеет большое научное и

практическое значение для экспериментальной и клинической гематологии, клеточной биологии и регенеративной медицины. Тема диссертации актуальна, результаты имеют существенную новизну, выводы достоверны. По совокупности полученных результатов работа Шипуновой Ирины Николаевны соответствует п.9 «Положения о присуждении ученых степеней №842 от 24 сентября 2013 г.(в ред. Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335). Автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Заместитель директора
по научной работе
ФГБУН «Государственный научный
центр Российской Федерации
Институт медико-биологических проблем»
Российской академии наук,
доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН



Буравкова Л.Б.
05.02.2019.

Подпись д.м.н. Л.Б. Буравковой заверяю

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



Левинских М. А.