

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО  
«Первый Санкт-Петербургский  
государственный медицинский  
университет имени акад. И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
академик РАН, д.м.н., профессор



 Ю. С. Полушин

« 08 7 » 2023 года

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертации Лучкина Антона Владимировича на тему: «Определение и динамическое исследование длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией на разных этапах течения болезни», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.1.28.Гематология и переливание крови

### Актуальность темы диссертационной работы

Механизмы развития приобретенной апластической анемии и факторы, влияющие на эффективность консервативного лечения, остаются актуальными направлениями научных исследований в мировом гематологическом сообществе. Интерес представляют не только иммунологические аспекты развития заболевания, но и механизмы, влияющие на нарушение регуляции клеточного цикла, в том числе запускающие появление хромосомных aberrаций. Изучается роль внутренних дефектов гемопоэтических стволовых клеток в патогенезе апластической анемии, возникающих в процессе их деления. Помимо развития клональных осложнений, выявления некоторых соматических мутаций, влияния стромального микроокружения в литературе обсуждается роль изменения длины

теломерных районов ДНК (теломеры) в развитии и течении заболевания. Теломеры имеют важное значение в защите генетического материала от повреждения в процессе концевой недорепликации и поддержании пролиферативного потенциала гемопоэтических стволовых клеток. Согласно литературным данным, длина теломер может служить маркером вероятности ответа на иммуносупрессивную терапию, частоты рецидивов болезни и риска развития клональных осложнений. Снижение пролиферативного потенциала гемопоэтических стволовых клеток в результате укорочения теломер может рассматриваться как один из механизмов недостаточности кроветворения при апластической анемии, в связи с чем исследования в данном направлении являются перспективными в контексте понимания патофизиологии болезни и рефрактерности к иммуносупрессивной терапии. Особый интерес связан с исследованием длины теломер в процессе иммуносупрессивной терапии для динамического мониторинга костномозгового резерва и повышения эффективности лечения.

Проведение дифференциальной диагностики теломеропатий во взрослом возрасте, протекающих с костномозговой недостаточностью, а именно врожденного дискератоза, и приобретенной аплазии костного мозга, вызывает сложность у клиницистов, в связи с чем разработка унифицированного метода измерения длины теломер и внедрение его в клиническую практику является актуальной задачей.

В связи с этим представленная диссертационная работа Лучкина Антона Владимировича по изучению длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией на разных этапах течения болезни является актуальным научным исследованием как для клиницистов-гематологов, так и для специалистов смежных специальностей, занимающихся диагностикой и лечением пациентов с теломеропатиями, имеющих помимо синдрома костномозговой недостаточности, изменения в других органах (печени, легких, коже и других).

## **Новизна исследований и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Автором диссертационной работы впервые были подробно и комплексно проанализированы изменения длины теломерных районов ДНК у больных с впервые диагностированной апластической анемией и в процессе комбинированной иммуносупрессивной терапии

Полученные оригинальные данные позволили сделать выводы и сформулировать рекомендации по выбору оптимального биоматериала и клеточных популяций при использовании метода проточной цитометрии с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (Flow-FISH).

Была проведена сравнительная характеристика длины теломерных районов ДНК не только в дебюте болезни, но и на различных этапах иммуносупрессивной терапии. Это позволило расширить понимание механизмов развития ответа и рефрактерности, достигаемых в процессе лечения.

Также проведено сравнение длины теломер у больных с впервые диагностированной апластической анемией с длиной теломер в нескольких контрольных группах (больные с рефрактерным течением приобретенной апластической анемии, больные с врожденным дискератозом, здоровые добровольцы).

### **Значимость для науки и практики**

Диссертационная работа имеет несомненную научную и практическую значимость.

Исследовательской группой в рамках диссертационной работы разработан алгоритм пересчета относительной длины теломер в абсолютные величины при помощи сопоставления двух методов: flow-FISH (сочетание проточной цитометрии с флуоресцентной гибридизацией *in situ*) и ПЦР (полимеразная цепная реакция) в реальном времени, получен патент на изобретение.

Впервые на группе больных апластической анемией был подробно проведен анализ наиболее подходящего для исследования длины теломер клинического материала с использованием методики flow-FISH. Было показано

отсутствии различий при использовании клеток периферической крови и костного мозга, а также разных клеточных популяций (мононуклерные клетки, лимфоциты, моноциты) на группе здоровых добровольцев, доноров и больных апластической анемией.

Автором было показано, что исследование длины теломер позволяет проводить точную дифференциальную диагностику между приобретенной апластической анемией и врожденным дискератозом у взрослых больных.

В диссертационной работе впервые проанализирована длина теломерных районов ДНК у пациентов с апластической анемией не только в дебюте болезни, но и на различных этапах иммуносупрессивной терапии, в зависимости от ответа на лечение. Рефрактерное течение, в отличие от впервые диагностированной апластической анемии, характеризовалось статистически значимым укорочением теломер. Наряду с этим более наличие более коротких теломер в пределах I-II квартиля значений здоровых доноров до начала иммуносупрессивной терапии было ассоциировано с меньшей вероятностью достижения гематологического ответа.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Полученные в диссертационной работе результаты исследования и выводы могут быть использованы в практической деятельности гематологических подразделений, в научно-исследовательской работе, в учебном процессе в медицинских институтах, институтах усовершенствования врачей. Результаты диссертационной работы могут послужить основанием для дальнейших исследований, направленных на изучение роли внутренних дефектов гемопоэтических стволовых клеток в патогенезе апластической анемии, её течения на фоне иммуносупрессивной терапии.

### **Личный вклад автора**

Автор проводил первичную диагностику и осуществлял ведение включенных в исследование больных совместно с другими врачами и научными сотрудниками отделения, принимал участие в разработке протоколов обследования и лечения

больных, выполнял лабораторную часть работы, подготовил основные публикации по выполненной работе, выступал с докладами на научно-практических конференциях.

### **Печатные работы**

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. Результаты методологической части работы были опубликованы в виде статьи и патента на изобретение.

### **Структура, содержание и оценка диссертационной работы**

Диссертационная работа построена по стандартному плану, изложена на 110 страницах машинописного текста, включает 22 рисунка и 18 таблиц. Библиографический указатель содержит 98 литературных источников. Диссертация состоит из основных разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Практические рекомендации», «Заключение», списка литературы. Работа характеризуется логичностью построения и четкостью изложения.

В разделе «Введение» раскрыта актуальность темы, степень ее разработанности, логично сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Обзор литературы подробно описывает современные концепции патогенеза апластической анемии. Детализированы основные терапевтические опции, протоколы лечения и механизмы действия используемых лекарственных препаратов. Большая часть обзора посвящена описанию структуры и функций теломерных районов ДНК, теломеразного и других белковых комплексов, играющих ключевую роль в поддержании длины теломер и защите генетического материала от повреждения. Освещены физиологические и патологические причины укорочения и удлинения теломер. Большое внимание уделено теломеропатиям, таким как врожденный дискератоз, идиопатический легочный фиброз и другие. В диссертации представлены данные литературы по влиянию укорочения длины теломер на общую выживаемость и ответ на лечение при

других заболеваниях крови (хроническом лимфолейкозе, миелодиспластическом синдроме, остром миелоидном лейкозе). В Разделе 1.3 подробно рассмотрены причины появления внутренних дефектов клеток предшественников гемопоэза, такие как появление клонального кроветворения и соматических мутаций, а также укорочение длины теломер. Автор уделяет большое внимание описанию механизмов укорочения длины теломерных районов ДНК у больных апластической анемией. Также приведены данные литературы по влиянию данного феномена на достижение ответа на лечение, развития рецидивов и клональных осложнений.

В раздел «Материалы и методы» приведены характеристики больных с апластической анемией до начала лечения и групп контроля (здоровые добровольцы и доноры, больные врожденным дискератозом и с рефрактерным течением заболевания), критерии включения. Графически в полной мере представлен дизайн исследования. Подробно изложена лабораторно-техническая часть работы с применением современных методов исследования: flow-FISH с использованием проточного цитометра и ПЦР в реальном времени. Показана разработанная формула перевода относительной величины в абсолютную с учётом полученной средней интенсивности флуоресценции клеток исследуемого образца с использованием клеток линии «1301» с известной длиной теломер, сопоставлены полученные результаты со значением абсолютной длины теломер у 21 здорового донора, определенные с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Построена модель перевода средней интенсивности флуоресценции, полученной при определении относительной длины теломер методом flow-FISH, в молекулярный эквивалент флуоресценции, что в свою очередь позволяет вычислить абсолютную длину теломер, выраженную в тысячах пар нуклеотидов. Разработанная формула имеет большое практическое значение и позволяет сравнивать полученные результаты с различными исследованиями других ученых.

Обсуждение результатов по определению абсолютной и относительной длины теломер у здоровых доноров, больных врожденным дискератозом, больных

апластической анемией с исследованием различного клинического материала и на разных этапах наблюдения приведено в отдельной главе. Отдельная часть диссертации описывает изменения длины теломер в процессе иммуносупрессивной терапии. Наглядно показано отсутствие значимых изменений этого параметра в общей группе и в зависимости от исходных значений. Сопоставлены данные о появлении новых хромосомных aberrаций и укорочении длины теломер. Полученные оригинальные данные критически обсуждаются автором в сравнении с актуальными литературными данными.

Заключение и выводы, сформулированные автором диссертационной работы, отражают основные результаты проведенного исследования. Даны практические рекомендации по определению абсолютной и относительной длины теломер на этапах дифференциальной диагностики и до начала иммуносупрессивной терапии у больных апластической анемией с целью прогноза ответа на лечения в совокупности с другими факторами риска.

#### **Недостатки по содержанию и оформлению работы**

Работа заслуживает положительной оценки. Отмечена высокая научно-практическая значимость как для врачей клинической практики, так и для дальнейших фундаментальных исследований. Обоснованность и достоверность сформулированных в диссертации научных положений и выводов не вызывает сомнений. В тексте диссертации имеются отдельные стилистические неточности, не влияющие на положительную оценку диссертационного исследования. Существенных замечаний по дизайну исследования, выбору методических подходов, анализу и интерпретации полученных данных и научной новизне нет.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация 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, является завершенной научно-квалификационной работой, содержащей новое

решение актуальных научных задач - выявление новых маркеров и предикторов ответа на лечение, дальнейшая оптимизация протоколов терапии и улучшения результатов лечения у больных апластической анемией на разных этапах терапии.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости, объёму и достоверности полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям пунктам 9. «Положения о порядке присуждения учёных степеней», от 24.09. 2013 года №842 (с изменениями от 26.09.2022 г., №1690), утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а ее автор Лучкин Антон Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 3.1.28. Гематология и переливание крови.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии с курсом детской онкологии ФПО имени профессора Б.В. Афанасьева ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, протокол № 13 от 28 августа 2023 года.

Профессор кафедры гематологии, трансфузиологии  
и трансплантологии с курсом детской онкологии ФПО  
имени профессора Б.В. Афанасьева ФГБОУ ВО  
«ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»

Минздрава России

доктор медицинских наук

Иван Сергеевич Моисеев

197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8,  
тел. 8(812) 338-78-95, e-mail: info@lspbgnu.ru; <https://www.lspbgnu.ru/ru/>

