

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, руководителя научно-исследовательского Центра клеточной и молекулярной патологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России на диссертационную работу Латыповой Марии Вадимовны на тему «Роль многоцветной флуоресцентной *in situ* гибридизации в качестве уточняющего метода кариотипирования при миелодиспластических синдромах», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови.

Актуальность темы диссертации

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу заболеваний системы крови опухолевой природы, в основе которых лежит поражение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), возникающее вследствие генетических и эпигенетических нарушений, дающих преимущество в пролиферации опухолевому клону. Это приводит к нарушению дифференцировки ГСК и клеток-предшественниц гемопоэза и повышенной чувствительности их к проапоптотическим факторам с развитием неэффективного гемопоэза (дисэритропоэза, дисгранулоцитопоэза и дисмегакариоцитопоэза), что клинически проявляется цитопениями в периферической крови. Для терминальной стадии МДС характерно накопление бластных элементов в костном мозге с высоким риском трансформации заболевания в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Важными диагностическими маркерами МДС являются хромосомные аномалии (ХА), которые можно определить примерно у половины пациентов, где комплексный кариотип со сложными хромосомными aberrациями (СХА) составляет 20 - 50%. Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) из-за своих ограничений не может корректно интерпретировать СХА, в отличие от многоцветного кариотипирования, реализуемого с помощью многоцветной флуоресцентной *in situ* гибридизации (mFISH). Этот метод позволяет идентифицировать все хромосомные aberrации в одном эксперименте, выделить истинно моносомный кариотип (МК) в составе комплексного, прояснить истинную природу СХА, выявить скрытые межхромосомные обмены, а также определить

состав дериватных и маркерных хромосом. В свою очередь это может пролить свет на выяснение роли отдельных хромосом в патогенезе заболевания.

В последние годы особое внимание уделяется изучению молекулярных маркеров при миелодиспластических синдромах, таких как *BAALC* и *WT1*, уровень экспрессии которых, по-видимому, связан с количеством экспрессирующих их ранних и более зрелых лейкозных стволовых клеток-предшественниц. Оценка динамики содержания этих клеток методом стандартной количественной ПЦР-РВ открывает перспективы к пониманию патогенеза различных цитогенетических вариантов МДС, механизмов его прогрессирования и рецидива.

Таким образом, изучение генетических характеристик опухолевых клеток, используя многоцветное кариотипирование, а также экспрессионные молекулярные маркеры является крайне актуальной задачей. Подобные исследования проводились крайне редко, и данные по международным исследованиям ограничены. Актуальность диссертационной работы Латыповой М.В. не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов диссертационного исследования

Научная новизна исследования не вызывает сомнений. В диссертационной работе автор впервые с использованием метода mFISH установила состав сложно-перестроенных дериватных и маркерных хромосом при МДС и определила неслучайное вовлечение в их формирование генетического материала 7-й, 4-й, 8-й и 12-й пар хромосом. Кроме того, применение данного молекулярно-цитогенетического метода у больных МДС и связанных с ними ОМЛ (ОМЛм) со сложным кариотипом (СК) позволило автору впервые идентифицировать неслучайные хромосомы-партнеры при формировании СК: для хромосомы 3 – 17-я; для 5-й – 7, 8, 12, 17-я; для 7-й – 2, 5, 12-я; для 8-й – 5, 12-я; для 12-й – 5, 7-я; для 13-й – 1, 5, 7-я.

Также в диссертации впервые показано, что экспрессия гена *BAALC* у 75% обследованных больных с синдромом изолированной делеции 5q была ниже порогового уровня.

Значимость для науки и практики результатов диссертации и конкретные пути их использования

Тема диссертационного исследования имеет несомненное практическое и фундаментальное значение. В работе Латыповой М.В. получены данные, которые в дальнейшем могут способствовать пониманию патогенеза МДС. В своем исследовании автор демонстрирует, что СЦИ оправдывает себя лишь при анализе простых кариотипов. В то время как для выявления aberrаций отдельных хромосом в составе СК, точного определения межхромосомных взаимодействий, расшифровки состава маркерных и дериватных хромосом, а также выделения истинно моносомных кариотипов в составе сложных у больных МДС необходимо использовать многоцветную FISH.

Автором было показано, что ХА при МДС гетерогенны, определяются с разной частотой в изолированном варианте и составе СК, а также различаются у детей и взрослых. Так, в ХА чаще принимают участие хромосомы 7-й, 5-й, 3-й, 8-й, 13-й и 12-й пар с разной частотой вовлеченности в изолированные хромосомные аномалии (ИХА) и состав СК; ХА 7-й хромосомы чаще являются изолированными по сравнению с хромосомами 12 и 13, а ХА 12-й хромосомы чаще определяются в СК по сравнению с aberrациями хромосом 3, 8 и 7; ИХА 3-й, 5-й и 12-й пар хромосом наблюдаются только у взрослых, в то время как ИХА 7-й, 8-й, 13-й – и у детей, и у взрослых; у пациентов со СК трансформация в ОМЛм происходит чаще по сравнению с пациентами с ИХА.

В работе было убедительно доказано, что mFISH является важным инструментом для анализа СХА при МДС и ОМЛм. Сравнение результатов кариотипирования показало, что mFISH дополняет и/или корректирует результаты СЦИ у 100 % пациентов со СК. Так, выявленные СЦИ 22 МК были подтверждены лишь у 6 пациентов. Все моносомии 5-й хромосомы и 80 % моносомий 7-й хромосомы оказались ложными. За определяемыми СЦИ делециями 5-й хромосомы у 55% пациентов скрывались несбалансированные транслокации с участием 5q. По данным mFISH в формировании СК у пациентов с МДС и ОМЛм принимают участие все хромосомы, но чаще всего вовлекаются хромосомы 5-й, 7-й, 12-й, 13-й, 8-й и 3-й пар. В СК самым частым типом ХА являются несбалансированные транслокации (96%). При этом сочетание aberrаций хромосом 5/7 и 5/7/8 является самым распространенным. В СК классические перестройки локуса 3q26 отсутствуют. Дополнительный анализ состава сложных

дериватных и маркерных хромосом у пациентов с МДС и ОМЛм с помощью mFISH показал неслучайное их формирование с участием хромосом 7-й, 12-й, 4-й и 8-й пар. При этом самым частым донором генетического материала является хромосома 7. Таким образом, анализ СК с помощью многоцветного кариотипирования создает условия для уточнения роли отдельных хромосом в патогенезе МДС.

У большинства обследованных больных МДС были отмечены повышенные уровни экспрессии гена *BAALC*. Исключением стали больные с синдромом изолированной делеции 5q, у 75 % которых экспрессия гена *BAALC* была ниже порогового уровня, что, по мнению автора, связано с биологическими особенностями этой патологии. Кроме того, пациенты с изолированной делецией 5q чаще имеют экспрессию гена *WT1* ниже порогового уровня по сравнению с пациентами МДС с другими ХА.

В условиях современной лаборатории метод определения уровней экспрессии генов *BAALC* и *WT1* в клетках костного мозга больных МДС легко реализуется, что открывает путь для более глубокого изучения патогенеза МДС и оценки эффективности лечения на уровне гемопоэтических стволовых клеток, что, в свою очередь свидетельствует о ценности диссертационной работы.

Результаты исследования внедрены в практическую и научно-исследовательскую работу отделения онкогематологии СПб ГБУЗ «Детская городская больница №1», научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Достоверность и обоснованность выводов, представленных в диссертационной работе Латыповой М.В., не вызывает сомнений, так как они основаны на достаточном объеме материала и длительном наблюдении. В общей сложности диссертантом был выполнен анализ данных по 130 пациентам с МДС и ОМЛм. Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования были проведены с использованием современной лабораторной базы. Выводы и

практические рекомендации рецензируемого исследования являются полностью обоснованными и соответствуют содержанию работы.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 37 рисунками и дополнена 13 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Последний содержит 118 литературных источников, из которых 13 - отечественных авторов и 105 – зарубежных.

Во **введении** диссертант представляет актуальность проблемы, четко формулирует цель и задачи диссертационной работы, характеризует научную новизну и практическую значимость проведенного исследования.

В **первой главе** представлен обзор литературных данных, касающихся самых частых цитогенетических изменений у больных МДС, а именно аномалий хромосом 3-й, 5-й, 7-й, 8-й, 12-й, 13-й и 17-й пар, а также сложного и моносомного кариотипов. Анализ литературных данных подтверждает недостаточную изученность выбранной темы и доказывает целесообразность применения mFISH при анализе СК у больных МДС и связанных с ними ОМЛ. Обзор литературных данных построен логично и охватывает весь спектр профильной современной научной литературы.

Во **второй главе** дана характеристика исследуемых групп пациентов, очень подробно описаны методы стандартного кариотипирования и многоцветной флуоресцентной *in situ* гибридизации, что свидетельствуют о высоком профессионализме соискателя, его понимании современных методик. Также приведен перечень статистических методов, используемых в диссертационной работе.

В **третьей главе** приведены результаты собственных исследований. На первом этапе дано описание клинических и лабораторных данных пациентов, сформированы несколько групп, куда вошли как пациенты с соответствующими изолированными ХА (в том числе с 1 ДХА), так и с ХА в составе СК. На втором

этапе обобщены результаты анализа СК с применением метода mFISH, произведен подсчет всех типов ХА и выявлены определенные закономерности в вовлечении хромосом в состав ХА. На третьем этапе проанализирован состав сложных дериватов, состоящих из 3 и более хромосом. Главу завершает анализ уровней экспрессии генов *BAALC* и *WT1* в клетках костного мозга больных МДС с разными цитогенетическими вариантами.

В четвертой главе приведено обсуждение полученных результатов, сопоставление с данными литературы. Выводы диссертационной работы полностью отвечают на поставленные задачи, непосредственно вытекают из материалов диссертации и подтверждены фактическим материалом. Положения, выносимые на защиту, соответствуют цели и задачам. Практические рекомендации логично вытекают из результатов выполненной научной работы.

Принципиальных замечаний по оформлению диссертации и автореферату, которые бы повлияли на положительную оценку работы, нет.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, из которых 5 публикаций - в журналах, индексируемых в базе данных Scopus, из них 4 статьи - в изданиях, рекомендованных в перечне ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Соответствие содержания автореферата основным идеям и выводам диссертации

Основные положения диссертационного исследования изложены в автореферате на 21 странице машинописного текста, дополненного иллюстрациями в виде таблиц и рисунков. В автореферате в сжатой форме отражены основные результаты исследования, обоснованы ключевые положения и выводы работы. Содержание автореферата соответствует сути диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Латыповой Марии Вадимовны на тему «Роль многоцветной флуоресцентной *in situ* гибридизации в качестве уточняющего метода кариотипирования при миелодиспластических синдромах», выполненная под руководством доктора медицинских наук Гиндиной Татьяны Леонидовны,

представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови, является законченной научно-квалификационной работой. По актуальности, методическому уровню, объему исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года, № 748 от 02 августа 2016 года, № 650 от 29 мая 2017 года, № 1024 от 28 августа 2017 года, № 168 от 01 октября 2018 года, № 1539 от 11 сентября 2021 года), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови.

Официальный оппонент:

руководитель научно-исследовательского Центра клеточной и молекулярной патологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»,

доктор биологических наук

Мартынкевич Ирина Степановна

«20» сентября 2024 г.

Подпись д.б.н. И.С. Мартынкевич 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»

191024, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. 2-Советская, д.16,

тел: +7 (812) 309-79-81, e-mail: bloodscience@mail.ru, <https://www.bloodscience.ru/>