

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Шипуновой Ирины Николаевны «Иерархическая структура стромального микроокружения кроветворной ткани в норме и при заболеваниях системы крови», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.21-гематология и переливание крови.

Диссертация И.Н.Шипуновой посвящена актуальной биомедицинской проблеме – исследованию состояния и иерархии негемопэтических клеток КМ в норме и при лимфопролиферативных заболеваниях.

Актуальность темы не вызывает сомнений. Действительно, с одной стороны, огромное количество исследователей работают со стромальными клетками КМ, называя их ММСК и МСК, понимая, в то же время, что имеют дело с гетерогенной популяцией клеток, но не принимая это во внимание. С другой стороны, практически не изучены изменяющиеся взаимоотношения между компартментами негемопэтических клеток КМ при развитии лимфопролиферативных заболеваний и при лечебных воздействиях. В то же время именно состояние этих взаимоотношений может быть ответственным за реакции организма на лечебные воздействия, неблагоприятные побочные эффекты и прогноз течения процесса.

Вышесказанное подтверждает **актуальность и выявляет практическую значимость работы.**

Диссертация написана в традиционном стиле и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (447 источников). Общий объем диссертации – 247 страницы. Основные результаты сведены в 27 таблиц и проиллюстрированы 49 рисунками. Кроме того диссертация содержит три приложения, включающие дополнения к главе «Материалы и методы».

Введение. Содержит все классические разделы, включая степень разработанности темы. Она вводит читателя в проблему, обосновывая цель и задачи диссертации.

Обзор литературы написан хорошим научным языком. Его объем – 25 страниц. Первый раздел посвящен обсуждению данных литературы, касающихся стромального микроокружения в костном мозге человека и мышцы. Он касается непосредственно темы диссертации – ниши для гемопэтических клеток, возрастных изменений и влияния паратиреоидного гормона и гидрокортизона на стромальные клетки КМ. Второй раздел под названием «Влияние патологического кроветворения на свойства клеток предшественниц стромального микроокружения» в значительной мере посвящен описанию анапластической анемии, ОМЛ и ОЛЛ – характеристике болезней, принципов лечения. Этот раздел без ущерба для диссертации можно было бы сократить, расширив в

нем подраздел стромальных клеток КМ. Это замечание носит рекомендательный характер. Обзор литературы подкреплен ссылками на статьи, около 40% из которых опубликованы за последние 10 лет.

Раздел «Материалы и методы». В работе использован большой спектр современных методов, адекватных цели и задачам исследования. Среди них: методы выделения и культивирования клеток КМ *in vitro* (спектр методик), методы молекулярной биологии – выделение ДНК и РНК из разного вида биологических материалов, ПЦР, иммунофенотипирование, кариотипирование, анализ экспрессии генов, анализ КОЕф, пролиферативного потенциала стромальных клеток и др. Многие из этих методов требуют высокой точности и тщательности в работе. К этому разделу замечаний нет. Описание методов позволяет воспроизвести результаты.

Результаты. На первом этапе работы автор изучила влияние цитостатиков в малых дозах на пул МСК (по формированию очага эктопического кроветворения у мышей) и КОЕф в тесте колониеобразования.

Установлено, что МСК нечувствительны к использованным цитостатикам, что подтверждает их стволовость. А эффект цитостатиков на КОЕ-ф различался: цитарабин повышал, бортезолиб не оказывал, а бисульфат и циклофосфан снижали ее. В целом автор делает заключение, что стромальные клетки относятся к медленно самообновляющейся ткани. В то же время к этому разделу есть несколько вопросов дискуссионного плана. В частности, не может ли резистентность к бортезолибу быть обусловлена просто отсутствием соответствующей мишени на этих клетках. Можно ли различить – два процесса: гибель клеток и их переход в другой пул под действием цитостатиков в использованных дозах? Ведь это бы изменило и концепцию. Являются ли эти дозы цитостатиков действующими? Не исследовалась ли пролиферативная активность стромальных клеток КМ животным после воздействия цитостатиков? Как изменилось общее количество стромальных клеток? Автор пишет об исчерпании пролиферативного потенциала МСК при построении очага эктопического кроветворения. Так ли легко его исчерпать? Ведь теломеры мышей достаточно длинные. Заданные вопросы носят дискуссионный характер, так как в работе получен ряд принципиально новых результатов, которые могут иметь разную интерпретацию.

В разделе работы, посвященном исследованию взаимного расположения ММСК и КОЕф КМ человека доказано, что ММСК расположены выше КОЕф в иерархии стромальных клеток КМ. Возникает вопрос, а исследовала ли автор КОЕф на 2-ом и последующих пассажах ММСК, и какие данные получены, и вписываются ли они в создаваемую концепцию иерархической структуры. И, в целом, насколько стабильно

соотношение популяций стромальных клеток в иерархии, какие переходы из одного пула клеток в другой являются обратимыми?

На следующем этапе автор исследовала взаимное расположение КОЕф и индуцибельных предшественников в КМ мышцы. Для этого был использован оригинальный прием: трансплантация КМ облученным животным и ретрансплантация его необлученным. Исследование содержания КОЕф в очагах эктопического кроветворения относительно размеров этих очагов позволило авторам сделать заключение, что КОЕф в иерархии стромальных стволовых клеток находятся выше «индуцибельных» предшественников. И, в конечном итоге, выстроить иерархическое древо стромальных клеток. В этом древе 5 компартментов клеток. Возникает вопрос дискуссионного плана. Являются ли эти компартменты клеток дискретными или клетки по свойствам образуют непрерывный ряд? Поскольку данные и концепция оригинальны, и заставляют задуматься, с какими же клетками работают многочисленные исследователи, называя их ММСК КМ, то хотелось бы знать мнение автора, сохраняется ли описанная иерархия при культивировании стромальных клеток КМ в пассажах, возможны ли обратимые переходы из одного компартмента в другой, или эта иерархия характерна только для КМ.

В следующем разделе работы автор изучает механизмы системной регуляции стромальных предшественников, а именно роль ПТГ, то есть дистантную гормональную регуляцию *in vitro* и *in vivo*.

Автором установлено, что длительное добавление ПТГ к культуре КМ не изменяет суммарную клеточную продукцию, практически не влияя на концентрацию кроветворных предшественников. Автор предположила, что ПТГ увеличивает количество ниш для кроветворных предшественников за счет остеобластов (несущих рецепторы к ПТГ). Это заставило предположить, что остеобласты входят в состав кроветворных ниш. Автор проверила это предположение методом конкурентной репопуляции, что позволило прийти к заключению, что клетки, отвечающие на ПТГ влияют на функциональный статус ранних кроветворных предшественников. То есть мишени ПТГ в КМ требуют дополнительных исследований.

На следующем этапе работы автор исследовала влияние ГК на ММСК человека. Исследования проведены *in vitro* с привлечением генетического анализа. Автором показано, что ГК снижает экспрессию генов ММСК, ответственных за их иммуномодулирующие свойства, а также генов остеодифференцировки и повышает экспрессию генов жировой дифференцировки. Влияние ГК на пролиферацию ММСК было индивидуальным и разнонаправленным у разных доноров: у 5 из 7 ГК ее снижал, а у 2 из 7 повышал. Но в среднем – снижал. Я бы составила заключение об индивидуальности

реакции, а автор— по средним цифрам сделала заключение о частичном ингибировании пролиферации. Но поскольку представлены и обработаны все данные, то читатель может дать свою интерпретацию.

В следующем разделе проанализированы данные о количественном изменении ММСК и КОЕф в КМ доноров разных возрастных групп. Автором получен ряд оригинальных и, в определенном смысле, уникальных данных о том, что концентрация КОЕф достоверно снижается с возрастом, равно как и клеточная продукция ММСК. Это сопровождается снижением экспрессии VEGF, то есть способности формировать новые сосуды. Параллельно усиливается экспрессия генов, ассоциированных с пролиферацией (FGF-2 и PDGF). Поскольку это происходит на фоне снижения пролиферации, то их экспрессию я бы отнесла (в самом общем смысле) к компенсаторным механизмам. В целом же в этом разделе получен ряд крайне интересных данных, вносящих вклад в понимание механизмов старения.

Далее автор анализирует статус стромального компонента КМ в условиях патологического кроветворения – при анапластической анемии. Получен ряд оригинальных результатов и выявлен ряд закономерностей, вносящих определенный вклад в понимание механизмов, поддерживающих этот патологический процесс. В частности, было установлено, что ММСК от больных существенно дольше размножаются в культуре, у них (особенно при тяжелых формах болезни) затруднена остеодифференцировка и не до конца происходит адиподифференцировка. Последний факт интересен и тем, что известно, что в КМ больных анапластической анемией увеличено количество адипоцитов. Тогда возникает вопрос - почему затруднена адиподифференцировка *in vitro*.

Кроме того, показано, что КОЕф у больных достоверно повышен равно как и величина колоний. Совокупность полученных в этом разделе данных свидетельствует об активации стромального микроокружения в КМ при анапластической анемии.

Последний раздел собственных результатов посвящен исследованию стромального микроокружения у больных ОМЛ и ОЛЛ до и после аллотрансплантации КМ (ТКМ). Диссертант обосновала клиническую значимость такого исследования.

Установлено, что клеточная продукция ММСК у доноров и больных до и после аллоТКМ—не различаются. При том, что экспрессия ряда генов, ассоциированных с пролиферацией, изменяется. ММСК оказались чувствительными к высоким дозам цитостатиков, что является, по мнению автора, аргументом в пользу того, что используемые многими исследователями ММСК не являются истинными СК. Клинически

значимым результатом этого раздела является то, что предтрансплантационное кондиционирование оказывает существенное воздействие на ММСК.

В разделе «**Заключение**» автор попыталась создать единую концепцию взаимосвязи субпопуляций клеток в КМ в норме, при старении и при развитии лимфопролиферативных заболеваний. Этот раздел свидетельствует о глубоком понимании автором проблемы, широте знаний и способности к научному анализу.

Все сделанные замечания носят дискуссионный характер.

Все полученные данные грамотно статистически обработаны, что подтверждает достоверность и адекватность выводов. **Выводы** соответствуют полученным результатам. **Автореферат** по содержанию полностью соответствует диссертации.

Большая часть полученных данных, подтверждающих выводы, опубликована в научных журналах из списка ВАК РФ и обсуждена на тематических научных конференциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Шипуновой Ирины Николаевны, является оригинальным, самостоятельно выполненным, законченным научным трудом, который имеет большое научное и практическое значение для гематологии, клеточной биологии и клинической практике. Тема диссертации актуальна, результаты имеют существенную новизну, основные 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-гематологии и переливание крови

Заведующая отделением

«Прогноза эффективности консервативного
лечения» МНИОИ им. П.А.Герцена-
филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ
доктор биологических наук, профессор

Согласна на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных.

Наталья Сергеевна Сергеева

Подпись д.б.н., проф. Натальи Сергеевны Сергеевой
«Заверяю»

Ученый Секретарь
МНИОИ им. П.А. Герцена-
филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ

Адрес: 125284, Москва, 2-ой Боткинский пр., д.3.
МНИОИ им. П.А. Герцена-
филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ
Тел. (495) 945-74-15, (495) 945-19-35
E-mail: prognoz.06@mail.ru



Елена Петровна Жарова