

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора медицинских наук, профессора Агеевой Татьяны Августовны на диссертационную работу Асауленко Захара Павловича «Дифференциальная характеристика мегакариоцитарного ростка миелоидной ткани в биопсиях костного мозга при первичном миелофиброзе и эссенциальной тромбоцитемии с мутациями в гене *JAK2* или *CALR*», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.2. Патологическая анатомия

Актуальность исследования

Диссертационное исследование посвящено группе редких заболеваний крови – Ph-негативным миелопролиферативным новообразованиям (MPN). К этой группе относятся первичный миелофиброз, истинная полицитемия и эссенциальная тромбоцитемия, клиничко-морфологические критерии диагностики которых формулировались только в последние 25-30 лет, что нашло отражение в 3-5 редакциях ВОЗ-классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей, когда впервые гистологическое исследование костного мозга было включено в перечень диагностически значимых критериев. Современная диагностика MPN носит критериальный характер и основывается на интеграции результатов патоморфологического исследования, клиничко-лабораторных показателей и данных молекулярно-генетического тестирования. До этого, исторически, в XX веке, диагностика MPN опиралась исключительно на клиничко-лабораторные сведения. В действующем 5-м издании Классификации ВОЗ (2022 г.) гистологическое исследование трепанобиоптатов костного мозга при MPN закреплено в качестве «большого» диагностического критерия.

В научных публикациях выстраивается парадигма диагностической работы с опухолевым субстратом – костным мозгом при MPN: микроскопический анализ - кариотипирование – FISH – PCR - полногеномное секвенирование - однонуклеотидный полиморфизм - РНК-секвенирование - ЧТО ДАЛЬШЕ? И ряд авторов, заглядывая вперед, обсуждают, как молекулярное профилирование при MPN может быть использовано в будущем для выбора конкретных молекулярно-таргетных методов лечения, а также роль дополнительных генетических методологий, выходящих за рамки анализа мутаций. Необходимо подчеркнуть, что указанный молекулярный путь безусловно требует дальнейшего внедрения и обобщения, но является очень трудоемким, дорогостоящим и не во всех гематологических клиниках реализуемым в повседневной практике. При этом микроскопическая оценка изменений в костном мозге остается базовым инструментом, а трактовка этих изменений субъективна и плохо воспроизводима. Необходимо отметить, что согласно открытым источникам научных публикаций, посвященных разным аспектам

проблемы MPN, 2/3 из них приходится на последние 10 лет, при этом половина из них – на последние 5 лет, отражая преимущественно вопросы молекулярной диагностики миелопролиферативных заболеваний, поиск прогностических молекулярных маркеров, подходов к таргетной терапии, а вопросы повышения качества рутинной микроскопической диагностики обсуждаются мало.

Диссертационная работа Асауленко З.П. посвящена двум нозологическим формам MPN - первичному миелофиброзу (ПМФ) и эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ), которые представляют наибольшую сложность для патоморфологической дифференциальной диагностики. Особенно остро эта проблема проявляется при исследовании трепанобиоптатов костного мозга с признаками гиперплазии миелоидной ткани при отсутствии выраженных диспластических изменений либо при «ранних» формах MPN.

Кроме того, верификация MPN требует интеграции результатов гистологического исследования и данных о молекулярном статусе. У 50–60% пациентов с ПМФ и ЭТ обнаруживается драйверная мутация *JAK2*, приводящая к автономной, цитокин-независимой активации сигнального пути и избыточной пролиферации клеток-предшественников. В 2013 году была открыта соматическая мутация *CALR*, выявляемая еще у 20–35% больных. Таким образом, мутации *JAK2* или *CALR* охватывают около 80% популяции пациентов с ПМФ и ЭТ, что делает их поиск обязательным элементом диагностического алгоритма.

В этой связи диссертационная работа З.П. Асауленко является актуальной и методологически значимой, так как она направлена на объективизацию и повышение точности патоморфологической дифференциальной диагностики ПМФ и ЭТ за счёт применения морфометрических и гистотопографических методов анализа структурных компонентов костного мозга, что воспроизводимо в любой патологоанатомической лаборатории, работающей с трепанобиоптатами костного мозга, в соотношении с мутационным профилем заболевания.

Перспективным направлением следует считать разработку алгоритмов искусственного интеллекта (ИИ) на основе полученных морфометрических и гистотопографических данных. Создание систем поддержки принятия диагностических решений на базе ИИ позволит улучшить качество патоморфологической дифференциальной диагностики ПМФ и ЭТ за счёт минимизации субъективного фактора при оценке гистологических изменений.

Научная новизна диссертационного исследования

В результате комплексного патоморфологического исследования трепанобиоптатов костного мозга впервые были морфометрически и с помощью программ компьютерного

анализа детализированы ключевые гистологические признаки, позволяющие дифференцировать ПМФ и ЭТ, а также оценены дополнительные морфологические критерии. Впервые сравнительный патоморфологический анализ в предложенном комплексе критериев проведен у пациентов, имеющих драйверной мутации *JAK2* либо *CALR*.

Установлено, что наиболее информативными оказались аномалии мегакариоцитарного ростка, которые варьируют в зависимости от нозологической формы, стадии заболевания и присутствия драйверной мутации *JAK2* или *CALR*.

В ходе работы впервые детально охарактеризованы гистотопографические и морфометрические особенности мегакариоцитов миелоидной ткани, что обеспечивает надежное разграничение ПМФ в префибротической и фибротической стадиях и ЭТ.

Впервые с использованием иммуногистохимического окрашивания трепанобиоптатов костного мозга антителом к CD42b разработан новый дифференциально-диагностический признак — пороговое количество CD42b-позитивных мегакариоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 400$.

Помимо этого, подтверждена прогностическая роль выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза у больных ПМФ. Впервые установлена корреляция между характером патологических изменений миелоидной ткани и типом драйверной мутации, а также выявлены соответствующие им клинико-лабораторные особенности течения заболеваний.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

Основные положения диссертационной работы были представлены на многочисленных всероссийских и международных научных конференциях. Материалы диссертации опубликованы в 22 научных трудах, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. По теме диссертации получены 2 патента на изобретение.

Структура, содержание и оценка диссертационной работы

Диссертационная работа З.П. Асауленко занимает 177 страниц машинописного текста и выполнена по классической структуре, включающей введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейших исследований, список сокращений и библиографию из 192 источников. В работе представлено 39 таблиц и 64 иллюстрации. Отдельного внимания заслуживают сделанные автором качественные микрофотографии, дополняющие текст.

Постановка задач полностью соответствует заявленной цели диссертационного исследования. Во введении содержатся разделы, посвящённые научной новизне, практическому значению работы и основным положениям, выносимым на защиту.

В первой главе «Обзор литературы» представлен всесторонний анализ отечественных и зарубежных публикаций. Дана краткая историческая справка, раскрывается современный подход к диагностике ПМФ и ЭТ, обсуждаются молекулярно-патогенетические аспекты Ph-негативных МПН, а также проблематика воспроизводимости гистологических критериев ВОЗ в этой группе заболеваний. Обоснована актуальность заявленных в диссертационной работе научных проблем.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны критерии отбора пациентов и формирования исследованных групп, методика патоморфологического исследования костного мозга, а также подходы к морфометрическому и гистотопографическому анализу мегакариоцитарного роста в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином/азуром II и эозином и в реакции с антителами к CD42b. Исследование проведено на материале трепанобиоптатов костного мозга 63 больных ПМФ и 59 пациентов с ЭТ.

Глава с результатами характеризуется детальным изложением, структурирована на разделы с достаточным количеством графиков и таблиц. Представлены клинко-лабораторные характеристики заболевания исследованных пациентов, а также результаты микроскопического анализа изменений миелоидной ткани в трепанобиоптатах костного мозга. Автором выявлены количественные, пространственные и цитологические особенности мегакариоцитарного роста у больных ПМФ и ЭТ с мутациями *JAK2* или *CALR*. Особенно ценно то, что предложен новый патоморфологический критерий на основе иммуногистохимического метода — пороговое количество CD42b-позитивных мегакариоцитов для дифференциальной диагностики этих заболеваний.

В «Обсуждении» соискатель З.П. Асауленко обобщает полученные результаты с учётом современных данных литературы, демонстрируя глубокое понимание актуальных проблем в дифференциальной диагностике ПМФ и ЭТ. Особое внимание уделено критериальной верификации диагноза и значимости выявления драйверных мутаций в диагностике и оценке прогноза. Продемонстрирована связь мутационного статуса с особенностями пространственного расположения мегакариоцитов, а также аномалиями строения их ядер. Автор справедливо отмечает, что при неполных клинко-лабораторных данных возможности точной диагностики MPN ограничены и эффективность существенно снижается, несмотря на применение гистологического исследования костного мозга и опытного исследователя.

Итоги работы в заключении чётко обобщены, включают систематизацию ключевых результатов, которые полностью соответствуют цели и задачам исследования. Практические рекомендации имеют значительную ценность для врачей-патологоанатомов, а перспективы дальнейших исследований обозначены чётко и убедительно.

**Степень обоснованности и достоверность
научных положений, выводов и рекомендаций**

Автор проанализировал 192 источника литературы, что обеспечило глубокую теоретическую проработку темы. Цели и задачи исследования чётко сформулированы и успешно реализованы в рамках тщательно разработанного дизайна. Выборка включает 122 пациента с ПМФ и ЭТ с подтверждённым мутационным статусом (мутации *JAK2* или *CALR*). Объём клинического и морфологического материала позволяет уверенно интерпретировать результаты как обоснованные и достоверные.

Для всех пациентов проведён комплексный клинико-anamнестический анализ, исследованы лабораторные и инструментальные данные, выполнено гистологическое, морфометрическое и гистотопографическое исследование трепанобиоптатов костного мозга, а также иммуногистохимический анализ мегакариоцитарного ростка миелоидной ткани с использованием антител к CD42b.

Все анализируемые морфологические феномены автор сопоставил в двух группах пациентов - с наличием мутации *JAK2* или *CALR*.

По итогу исследования автор вынес на защиту четыре положения:

Первое положение выявляет связь между мутационным статусом и клинико-лабораторными особенностями ПМФ и ЭТ. Так, мутации *CALR* ассоциируются с молодым возрастом пациентов и повышенным количеством тромбоцитов в общем анализе крови, тогда как мутации *JAK2* характеризуются более выраженным лейкоцитозом, эритроцитозом, повышением концентрации гемоглобина в сочетании с более высокой частотой развития спленомегалии. Представленное положение основано на тщательном анализе клинико-лабораторных сведений и подтверждено статистической обработкой данных.

Второе и третье положение, выносимое на защиту, сформулированы на основании детального микроскопического анализа предлагаемых патоморфологических диагностических признаков ПМФ и ЭТ: клеточность костного мозга, лейко-эритробластическое соотношение, наличие или отсутствие гиперплазии ростков кроветворения, количественные, топографические и морфологические аномалии мегакариоцитарного ростка, наличие и выраженность ретикулинового и коллагенового фиброза.

Особое значение при микроскопической дифференциальной диагностике имеет анализ изменений мегакариоцитарного ростка, учитывая особенности размеров и формы мегакариоцитов, размеров их ядер, топографию их расположения в лакунах, плотность и размеры мегакариоцитарных кластеров.

В своем исследовании Асауленко З.П. выполнил углубленный тщательный морфометрический и компьютерный анализ предлагаемых классических микроскопических критериев ПМФ и ЭТ (форма и размеры ядер, цитоплазмы и клеток в целом по нескольким параметрам), дополнительно оценив количество мегакариоцитов в кластере, расстояние между мегакариоцитами, кластерами и костными балками в нескольких координатах. Такой подход позволило автору объективизировать светооптическую микроскопическую картину, повысить качество и воспроизводимость диагнозов ПМФ и ЭТ.

Во втором положении автором подчеркивается, что указанные микроскопические изменения в костном мозге больных ПМФ и ЭТ достоверно отличаются по ряду признаков: количеству, размерам и характеру мегакариоцитарных скоплений, строению ядер мегакариоцитов, доли миелоидной ткани, лейко-эритробластическому соотношению, а также степени выраженности ретикулинового и коллагенового фиброза и остеосклероза. Комплексный анализ этих параметров позволяет проводить патоморфологическую диагностику и дифференцировать случаи с мутациями *JAK2* или *CALR*.

Третье положение указывает на наличие связи между мутацией *CALR* и степенью гиперплазии мегакариоцитарного ростка в миелоидной ткани. Сравнительный анализ пространственного расположения и структурных особенностей мегакариоцитов в *CALR*-позитивных случаях ЭТ демонстрирует близость этих признаков с префибротической стадией ПМФ.

Четвёртое положение доказывает, что морфометрический и гистотопографический анализ мегакариоцитарного ростка при иммуногистохимическом исследовании с использованием антител к CD42b служит дополнительным достоверным критерием для дифференциальной диагностики ПМФ и ЭТ.

Достоверность результатов, представленных в диссертации, обусловлена грамотным подбором и достаточным объёмом выборки анализируемых групп пациентов, использованием современных методов исследования, достаточных для решения поставленных задач, что позволяет сделать обоснованные выводы. В работе применен комплексный подход, включающий микроскопический, гистохимический, иммуногистохимический, морфометрический анализ структурно-функционального состояния костного мозга пациентов изучаемых групп, которые были соотнесены с клиническими

критериями проявлений и осложнений заболевания на основании анализа амбулаторных и стационарных медицинских карт. Полученные данные подвергнуты адекватному статистическому анализу, что обеспечивает высокую точность и объективность полученных данных. Цели и задачи диссертационного исследования выполнены полностью.

Личный вклад соискателя в исследование

Вклад соискателя охватывает все основные этапы разработки и реализации исследования. Автор диссертационной работы самостоятельно произведен отбор пациентов, которым выполняли диагностическую трепанобиопсию костного мозга для верификации диагноза, проанализированы результаты молекулярно-генетического тестирования, собраны клинико-лабораторные сведения. Диссертантом произведены гистологическая оценка трепанобиоптатов костного мозга, выполнены морфометрический и гистотопографический анализ мегакариоцитарного ростка в биопсиях костного мозга, окрашенных гематоксилином/азуром II и эозином и в реакции с антителами к CD42b. Статистическая обработка проанализированных показателей выполнена З.П. Асауленко самостоятельно. Диссертантом лично реализованы апробация результатов, подготовка публикаций и научных выступлений, а также оформление текста и автореферата диссертации.

Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования

Полученные в диссертационной работе результаты обладают высокой практической ценностью и подлежат внедрению в работу патологоанатомических отделений, работающих с трепанобиоптатами костного мозга. Следует отметить, что методики гистотопографического, морфометрического и иммуногистохимического анализа миелоидной ткани при ПМФ и ЭТ, разработанные соискателем, уже нашли практическое применение в диагностической деятельности подразделений следующих учреждений: патологоанатомического отделения клинической молекулярной морфологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, патологоанатомического отделения СПб ГБУЗ «Городская Больница № 40», патологоанатомического отделения ГБУЗ ЛОКБ, патологоанатомического отделения КГБУЗ ККПАБ, патологоанатомического отделения ООО «Лаборатория Гемотест».

Замечания по диссертационной работе

Принципиальных замечаний к дизайну исследования, выбору методологических подходов, обоснованности положений и сформулированных выводов, а также к их практической и теоретической значимости нет. Исследование отличается логичностью

построения, внутренней согласованностью и обоснованным выбором методов анализа. Существенных замечаний по структуре, содержанию и оформлению диссертации З.П. Асауленко также не имеется. На основании полученных данных сформулировано четыре вывода, которые последовательно следуют из представленных в диссертации материалов. Содержание автореферата диссертации дает полное представление о проведенном исследовании, соответствует требованиям ВАК РФ паспорта научной специальности и отражает основные положения диссертационной работы.

В порядке дискуссии хотела бы задать следующие вопросы:

1. В научной литературе описан феномен эмпериполеза мегакариоцитов при MPN, однако его распространенность и клинико-прогностическое значение требуют уточнения. Насколько часто вы наблюдали этот феномен при микроскопическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга, для какого из вариантов MPN этот феномен наиболее характерен? По вашим наблюдениям либо по данным литературы имеется ли его ассоциация с развитием фиброза при ПМФ?

2. Почему для иммуногистохимического исследования был выбран маркер CD42b, а не более дешевый и широко используемый в практике аналог CD61? Планируется ли в дальнейшем валидация предложенных пороговых значений для маркера CD61 с целью повышения экономической эффективности и доступности методики?

3. Какие из изученных вами структурных феноменов при ПМФ и ЭТ являются наиболее значимыми в дифференциальной диагностике ранних форм данных заболеваний? На что вы посоветуете обратить внимание практикующему патологоанатому?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Асауленко Захара Павловича «Дифференциальная характеристика мегакариоцитарного роста миелоидной ткани в биопсиях костного мозга при первичном миелофиброзе и эссенциальной тромбоцитемии с мутациями в гене *JAK2* или *CALR*», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.2. Патологическая анатомия, представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой решена актуальная научная задача: впервые установлены корреляции между гистотопографическими и морфометрическими характеристиками мегакариоцитарного роста, мутационным статусом (*JAK2/CALR*) и клинико-лабораторными показателями, разработаны дополнительные критерии дифференциальной диагностики первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований, научной и практической значимости полученных результатов, представленная работа

