

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора медицинских наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ, заведующей кафедрой лабораторной медицины с клиникой института медицинского образования ФГБУ НМИЦ имени В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации г. Санкт-Петербурга Вавиловой Татьяны Владимировны на диссертационную работу Почтаря Евгения Владимировича «Экспрессия В-клеточных маркеров ROR-1, CD180 и значение субпопуляций Т-лимфоцитов и натуральных киллеров в оценке течения хронического лимфолейкоза», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика»

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа посвящена проблеме поиска новых диагностических маркеров, сохраняющих стабильную экспрессию, как в дебюте, так и в ходе лечения пациентов с хроническим лимфолейкозом с целью использования их в оценке остаточной опухолевой популяции, а также проблеме изучения субпопуляционного состава Т-, НК-клеток и моноцитов, что позволит оценить состояние иммунного статуса пациентов до начала и после проведения иммунохимиотерапии.

Некоторые В-клеточные лимфопролиферативные новообразования имеют сходные клинические, морфологические и фенотипические особенности, что диктует необходимость поиска новых дифференциально-диагностических маркеров. Использование различных химиотерапевтических режимов, таргетных препаратов может формировать рефрактерный фенотип опухолевых клеток. Кроме того, мембранная экспрессия диагностических маркеров изменяется в зависимости от применяемых схем лечения.

Изучение субпопуляционного состава Т-, НК-клеток и моноцитов имеет большое значение в оценке клеточного и неспецифического звеньев иммунитета до начала терапии и в период иммунохимиотерапии, поскольку

инфекционные осложнения часто осложняют течение хронического лимфолейкоза. Таким образом, тема диссертационной работы Е.В. Почтаря актуальна и своевременна. Цель и поставленные задачи в диссертации являются актуальными в современной клинической гематологии.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Тема диссертационного исследования посвящена поиску новых диагностических маркеров, сохраняющих стабильную экспрессию, как в дебюте, так и в ходе лечения пациентов с хроническим лимфолейкозом с целью использования их в оценке остаточной опухолевой популяции, а также проблеме изучения субпопуляционного состава Т-, НК-клеток и моноцитов, что позволит оценить состояние иммунного статуса пациентов до начала и после проведения иммунохимиотерапии. По своей тематике диссертационная работа полностью соответствует паспорту специальности 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика» №9: «Разработка методов иммунологических исследований. Антигены эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, белков плазмы, HLA-системы. Оценка функциональной активности клеток иммунной системы. Антитела естественные, иммунные и аутоиммунные, иммунные комплексы. Медиаторы иммунитета. Оценка иммунного статуса организма. Мониторинг иммунокорректирующей терапии. Иммунофенотипическая характеристика клеток при заболеваниях крови. Онкоиммунология».

Основные результаты диссертации

В ходе исследования автор описывает последовательность выявления 16 субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток: Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, Т-НК-клеток, Т-хелперов наивных и памяти, активированных Т-лимфоцитов и НК-клеток по экспрессии соответствующих антигенов. Пересчет абсолютного числа субпопуляций лимфоцитов осуществлялся двухплатформенным методом, исходя из абсолютного количества лимфоцитов в гемограмме и относительного числа

субпопуляций лимфоцитов, определяемого методом многоцветной проточной цитометрии.

Автор не только подробно описывает полученные данные, но и сопоставляет их с представленными в литературе.

Оценивая экспрессию антигенов ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах, автор показывает, что у доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом практически все В-лимфоциты экспрессировали CD180 и не экспрессировали ROR-1, а экспрессия ROR-1 определялась на В-лимфоцитах во всех случаях ХЛЛ и оставалась стабильной в процессе лечения независимо от длительности и применяемых схем лечения ($r=0,9174$). В то время как CD180 на В-лимфоцитах пациентов с ХЛЛ отличалась вариабельностью и регистрировалась у 76,0% пациентов в дебюте заболевания и 65,0% пациентов, находящихся на терапии.

Оригинальным является сравнение двух иммунофенотипических подходов в оценке МОБ при ХЛЛ. Автор в ходе анализа данных приходит к заключению, что данные методы обладают высокой корреляцией ($r=0,9936$). Однако, использование в панели ROR-1 имеет преимущество, так как позволяет сократить число анализируемых пробирок с двух до одной, снизить расходные материалы (CD45, CD19, CD5; лизирующий реагент), а также заменить оценку легких цепей для определения клональности В-лимфоцитов. Статистический анализ полученных данных проведенный автором при оценке субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до лечения и в динамике терапии больных хроническим лимфолейкозом показал, что у пациентов с первично выявленным ХЛЛ по сравнению с контролем отмечается достоверное увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов ($p<0,0001$), Т-хелперов ($p<0,0001$) за счет Т-хелперов памяти ($p<0,0001$), цитотоксических Т-клеток ($p<0,0001$), активированных Т-лимфоцитов с маркерами ранней ($p<0,0001$) и поздней активации ($p<0,0001$). Также, автором описывается, что у пациентов, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб, отмечается значительное увеличение абсолютного количества Т-

лимфоцитов (преимущественно за счет Т-хелперов-памяти) ($p < 0,0001$), НК-клеток ($p < 0,0001$), а также субпопуляций НК-клеток, несмотря на заметное снижение относительного числа Т-лимфоцитов и НК-клеток. Выявлено достоверное повышение абсолютного числа активированных Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации ($p < 0,0001$ и $p = 0,0005$ соответственно) и регуляторных Т-клеток ($p = 0,0002$) по сравнению с донорами. Также отмечалось значительное увеличение абсолютного числа регуляторных Т-лимфоцитов ($p = 0,0109$), субпопуляции $TCR\gamma\delta$ -Т-клеток ($p = 0,0003$) и НК-клеток ($p < 0,0001$). Подробный анализ данных позволил автору прийти к заключению, что при ХЛЛ имеют место существенные нарушения клеточного и неспецифического иммунитета. Автор делает вывод о том, что терапия ибрутинибом приводила к восстановлению иммунологического дисбаланса, снижению количества активированных Т-лимфоцитов ($p < 0,0001$), наивных Т-хелперов, $TCR\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов ($p < 0,0001$). Анализ изменений абсолютного числа регуляторных Т-клеток показал положительную динамику их снижения при использовании ибрутиниба, что, по мнению автора, свидетельствует о повышении противоопухолевого ответа. В разделе посвященном оценке субпопуляционного состава моноцитов периферической крови автор показывает снижение относительного числа классических моноцитов (МО1) и увеличение неклассических моноцитов (МО3) у пациентов ХЛЛ, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниба, по сравнению с контролем и другими группами пациентов ХЛЛ ($p = 0,0003$, $p = 0,0019$, $p = 0,017$ и $p = 0,0025$, соответственно и $p = 0,0026$, $p < 0,0001$, $p = 0,0002$ и $p = 0,0001$, соответственно), а также увеличение процента промежуточных форм моноцитов (МО2) во всех исследуемых группах по отношению к донорам ($p = 0,0234$, $p = 0,0051$, $p = 0,0061$ и $p = 0,0332$, соответственно). В тоже время, анализ абсолютных значений субпопуляций моноцитов периферической крови при ХЛЛ не выявил достоверных различий с контрольной группой и между анализируемыми подгруппами пациентов.

Достоверность результатов исследования

Диссертационная работа выполнена по традиционному плану на высоком методическом уровне, достаточном количестве материала, с хорошо разработанным дизайном, учитывающим требования, предъявляемым к научным исследованиям. Достоверность результатов исследования подтверждается качественно спланированным дизайном работы, достаточным объемом проведенных исследований и адекватным статистическим анализом полученных данных.

В исследование включено 30 практически здоровых доноров, 296 пациентов с ХЛЛ, из них 50 с первично выявленным, нелеченым ХЛЛ и 246 - находящихся на терапии, 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом (инфекционный мононуклеоз и другие вирусные инфекции, ревматоидный артрит). Приведены ясные и четкие критерии включения и исключения пациентов в клиническую часть исследования.

Для оценки экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах исследовано 160 образцов крови, из них 50 с первично выявленным или нелеченым ХЛЛ, 60 образцов крови пациентов, получавших различные схемы терапии; 20 образцов с реактивным лимфоцитозом и 30 образцов крови доноров.

Выводы проведенного исследования корректны, аргументированы и соответствуют полученным результатам.

Научная новизна

Полученные соискателем ученой степени научные данные позволили утверждать, что экспрессия ROR-1 определяется на всех опухолевых В-лимфоцитах, в то время как экспрессия CD180 вариабельна и выявлялась в 76% случаев пациентов ХЛЛ в дебюте заболевания и у 65% пациентов на различных схемах терапии. Стабильность экспрессии ROR-1 на опухолевых клетках, независимо от применяемых схем лечения, может использоваться в оценке минимальной остаточной болезни (МОБ) при ХЛЛ.

Использование маркера ROR-1 для оценки МОБ ХЛЛ упрощает

проведение иммунофенотипического исследования, позволяет отказаться от оценки клональности В-лимфоцитов по рестрикции легких цепей, что позволяет рекомендовать данный метод для рутинной практики в клинко-диагностических лабораториях медицинских организаций.

Также автором изложены новые положения об особенностях изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови в дебюте ХЛЛ и в ходе лечения различными схемами терапии. Впервые установлено восстановление нарушенного иммунологического баланса, а также снижение абсолютного числа регуляторных Т-клеток, что свидетельствует о повышении противоопухолевого ответа при использовании ибрутиниба в лечении ХЛЛ.

Расширены представления о субпопуляционном составе моноцитов периферической крови у пациентов ХЛЛ и доказано значение использования абсолютных показателей в интерпретации результатов.

Значимость полученных соискателем результатов для науки и практики

Полученные соискателем ученой степени научные данные позволили утверждать, что экспрессия ROR-1 определяется на всех опухолевых В-лимфоцитах, в то время как экспрессия CD180 вариабельна и выявлялась в 76% случаев пациентов ХЛЛ в дебюте заболевания и у 65% пациентов на различных схемах терапии. Стабильность экспрессии ROR-1 на опухолевых клетках, независимо от применяемых схем лечения, может использоваться в оценке минимальной остаточной болезни (МОБ) при ХЛЛ.

На основании результатов исследования Почтаря Е.В. выявлена высокая корреляция двух методов оценки МОБ – международного стандартизированного 8-цветного метода и набора Dura Clone (BC), включающего ROR-1. Использование маркера ROR-1 в панели оценки МОБ ХЛЛ упрощает иммунофенотипическое исследование, а также заменяет оценку клональности В-лимфоцитов по рестрикции легких цепей, что позволяет рекомендовать данный метод в практике клинко-диагностических лабораторий медицинских организаций.

Изложены новые положения об особенностях изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови в дебюте ХЛЛ и в ходе лечения различными схемами терапии. Впервые установлено восстановление нарушенного иммунологического баланса, а также снижение абсолютного числа регуляторных Т-клеток, что свидетельствует о повышении противоопухолевого ответа при использовании ибрутиниба в лечении ХЛЛ.

Расширены представления о субпопуляционном составе моноцитов периферической крови у пациентов ХЛЛ.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Почтаря Е.В. написана в соответствии с современными требованиями: состоит из введения, пяти глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и указателя литературы. Работа изложена на 141 странице машинописного текста, иллюстрирована 17 таблицами и 38 рисунками. Библиографический указатель включает 196 источников, из которых 41 отечественных и 155 зарубежных авторов.

Во введении дано обоснование актуальности диссертации, изложены цели, задачи исследования, показана новизна и практическая значимость работы. Введение написано четко, кратко, сформулированные задачи соответствуют цели исследования.

В обзоре литературы приведено определение ХЛЛ, диагностические критерии постановки данного диагноза (ВОЗ, 2022), краткая характеристика заболевания. Далее автор переходит к подробному описанию структуры, функции маркеров CD180 и ROR-1; оценке МОБ различными методами в настоящее время, разбирает достоинства и недостатки каждого из методов. Раздел 1.1 в литературном обзоре логично завершается тезисом, что существует проблема поиска новых маркеров для оценки МОБ, одним из вариантов решения которой может явиться маркер ROR-1.

Раздел 1.2 посвящен описанию субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток при ХЛЛ по данным литературы.

Обзор литературы показал, что данных об изменении состава Т-лимфоцитов, НК-клеток в ходе терапии ХЛЛ немного, а работы по анализу количества и субпопуляционного состава моноцитов при ХЛЛ и вовсе малочисленны и противоречивы.

В исследование включено 30 практически здоровых доноров, 296 пациентов с ХЛЛ, из них 50 с первично выявленным, нелеченым ХЛЛ и 246 - находящихся на терапии, 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом (инфекционный мононуклеоз и другие вирусные инфекции, ревматоидный артрит). Приведены ясные и четкие критерии включения и невключения пациентов в клиническую часть исследования.

Для оценки экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах исследовано 160 образцов крови, из них 50 с первично выявленным или нелеченым ХЛЛ, 60 образцов крови пациентов, получавших различные схемы терапии; 20 образцов с реактивным лимфоцитозом и 30 образцов крови доноров.

Для сравнительного исследования двух иммунофенотипических подходов в оценке МОБ проанализировано 64 образца костного мозга (КМ) и 6 - периферической крови пациентов с ХЛЛ. В данной главе подробно описаны протоколы проведения иммунофенотипирования для оценки МОБ, приведены панели моноклональных антител, сам процесс выявления опухолевой популяции клеток.

Далее автор описывает процесс выявления 16 субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток: Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, Т-НК-клеток, Т-хелперов наивных и памяти, активированных Т-лимфоцитов и НК-клеток по экспрессии соответствующих антигенов. Пересчет абсолютного числа субпопуляций лимфоцитов осуществляли двухплатформенным методом, исходя из абсолютного количества лимфоцитов в гемограмме и относительного числа субпопуляций лимфоцитов, определяемого методом многоцветной проточной цитометрии.

В ходе данного исследования определяли 3 субпопуляции моноцитов: классические моноциты (MO1-CD14++CD16-), промежуточные (MO2-CD14++CD16+) и неклассические (MO3-CD14+CD16++). В работе также подробно описана технология выделения субпопуляций моноцитов.

В завершении данной главы подробно описано каким образом проводилась статистическая обработка результатов, и в качестве достоинства работы следует отметить, что автор использовал различные статистические методы анализа в зависимости от того подчинялось ли распределение данных в выборке нормальному закону распределения.

В первом разделе главы, посвященной результатам, автор проводит оценку экспрессии антигенов ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах, в ходе которой устанавливает, что у доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом практически все В-лимфоциты экспрессировали CD180 и не экспрессировали ROR-1, а экспрессия ROR-1 определялась на В-лимфоцитах во всех случаях ХЛЛ и оставалась стабильной в процессе лечения.

Во втором разделе данной главы автор проводит сравнение двух иммунофенотипических подходов в оценке МОБ при ХЛЛ и в ходе анализа данных приходит к заключению, что использование в панели ROR-1 имеет преимущество, так как позволяет сократить число анализируемых пробирок с двух до одной, снизить расходные материалы (CD45, CD19, CD5; лизирующий реагент), а также заменить оценку легких цепей для определения клональности В-лимфоцитов.

В третьем и четвертом разделе оцениваются субпопуляции Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до и в динамике терапии больных хроническим лимфолейкозом. Подробный анализ данных позволил автору прийти к заключению, что при ХЛЛ имеют место существенные нарушения клеточного и неспецифического иммунитета.

В пятом разделе проводится оценка субпопуляционного состава моноцитов периферической крови. В ходе исследования установлено, что основная субпопуляция моноцитов периферической крови при ХЛЛ

представлена классическими моноцитами. Анализ абсолютного количества субпопуляций моноцитов выявил лишь достоверное значительное увеличение числа классических моноцитов у пациентов, находящихся на длительной терапии ибрутинибом. При этом абсолютные значения других субпопуляций моноцитов достоверно не отличались как среди групп пациентов ХЛЛ между собой, так и с донорами.

В главе «Обсуждение» автор анализирует и обобщает результаты собственных наблюдений в сопоставлении с результатами, полученными в исследованиях других авторов. Подробно рассматривается возможное влияние таргентных препаратов на иммунную систему пациентов с ХЛЛ. Например, в данной диссертационной работе показано, что терапия ибрутинибом приводит не только к снижению числа В-лимфоцитов, но одновременно к значительным изменениям в субпопуляционном составе Т- и НК-клеток.

Выводы, сделанные автором, логически вытекают из обобщенных результатов собственных наблюдений, соответствуют цели исследования и поставленным задачам; сформулированы ясно и четко.

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных замечаний по дизайну и существу диссертационного исследования, снижающих значение выполненной работы, нет. Следует отметить, что как положения, выносимые на защиту, так и выводы, в значительной части сформулированы в виде результатов исследования, что затрудняет их восприятие, но не умаляет достоинства диссертации.

В процессе ознакомления с работой возникли следующие вопросы.

- 1) Автор отметил, что «комплексное иммунофенотипическое исследование субпопуляционного состава лимфоцитов показало, что при ХЛЛ имеют место существенные нарушения клеточного и неспецифического иммунитета». Какие клинические проявления данных нарушений встретились в исследованных группах как при первичной диагностике, так и в процессе терапии?

- 2) Каким образом на основании полученных данных автор предполагает строить прогноз инфекционных осложнений, который позиционируется в практических рекомендациях?

Заключение

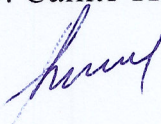
Диссертационная работа Почтаря Евгения Владимировича на тему «Экспрессия В-клеточных маркеров ROR-1, CD180 и значение субпопуляций Т-лимфоцитов и натуральных киллеров в оценке течения хронического лимфолейкоза», выполненная на кафедре клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, под руководством доктора медицинских наук Луговской С.А., представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика», является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены данные, позволяющие решить актуальные научные задачи, имеющие существенное значение для развития клинической лабораторной диагностики: применение новых стабильных маркеров для диагностики и мониторинга течения хронического лимфолейкоза с использованием информативных показателей в оценке субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов периферической крови.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, представленная работа Почтаря Е.В. соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Почтарь Евгений Владимирович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая

лабораторная диагностика.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ,
заведующий кафедрой лабораторной медицины с клиникой института
медицинского образования ФГБУ НМИЦ имени В.А. Алмазова Министерства
здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург



Т.В. Вавилова

Подпись д.м.н., профессора Т.В. Вавиловой заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ НМИЦ имени В.А. Алмазова
Минздрава России, профессор



«28» 12 2023 года

Недошивин А.О.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России). 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2.

Тел.: +7 (812) 702-37-30. E-mail: fmrc@almazovcentre.ru