

Отзыв

официального оппонента – доктора медицинских наук, заведующего лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница», заведующего лабораторией клеточной терапии онкогематологических заболеваний Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий»
Цаура Григория Анатольевича 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»
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика»

Актуальность темы диссертации

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) — хроническое онкогематологическое заболевание, характеризующееся прогрессирующим накоплением моноклональных В-лимфоцитов. ХЛЛ является наиболее распространенным типом лейкоза в США, Западной и Восточной Европе, а также в нашей стране. Установлен эпидемиологический профиль ХЛЛ, согласно которому заболевание чаще встречается у мужчин при соотношении мужчин и женщин 1,2:1-1,7:1. Считается, что это заболевание чаще выявляется пожилых людей; средний возраст которого на момент постановки диагноза составляет около 70 лет. Заболеваемость ХЛЛ варьирует в зависимости от расы и географического положения: она выше среди представителей европеоидной расы и крайне низка в Азии, что лишь частично можно объяснить возрастными различиями.

Разработка новых таргетных препаратов для лечения ХЛЛ, в том числе,

ингибиторов тирозинкиназы Брутона (ВТКі; ибрутиниб и акалабрутиниб), ингибиторов BCL2 (венетоклакс) и ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3Kі; иделалисиб и дувелисиб), фундаментально изменила ландшафт терапии ХЛЛ, и значительно улучшила прогноз пациентов с ХЛЛ. При использовании ВТКі пятилетняя общая выживаемость (ОВ) составляет более 60%, а при включении в терапию венетоклакса превышает 80%.

Хорошо известно, что прогноз ХЛЛ связан не только с проводимой терапией, но с инициальными цитогенетическими и молекулярно-генетическими характеристиками опухолевого клона, такими как комплексный кариотип, делеции 17p, мутации *TP53*, *IGHV*. Вторым важнейшим прогностическим фактором является ответ опухоли на проводимую терапию. Существующий на сегодня дуализм в терминологии, как правильно называть остаточные лейкемические клетки – минимальная остаточная болезнь (minimal residual disease) или измеряемая остаточная болезнь (measurable residual disease) не меняет сути проблемы, подчеркивая лишь большую или меньшую настороженность в клинической интерпретации получаемых отрицательных результатов определения МОБ.

Важно подчеркнуть, что МОБ отражает не только количество опухолевых клеток в организме пациента, но и технологическую способность достоверно выявлять и количественно оценивать эту величину. Более того, проводимая пациентам с ХЛЛ современная таргетная терапия существенно меняет экспрессию опухолевых белков на клетках ХЛЛ. В связи с этим поиск новых и лабораторная валидация уже известных маркеров является актуальной проблемой клинической лабораторной диагностики.

Также важно рассматривать болезнь и ее лечение не изолированно, а как составную часть сложного комплекса иммунологических реакций, включая изменения популяционного состава Т-лимфоцитов, естественных (натуральных) киллеров, моноцитов крови. Часто эти моменты остаются за пределами внимания гематологов и врачей клинической лабораторной диагностики.

Именно ликвидации вышеуказанных «белых пятен» посвящена диссертационная работа Евгения Владимировича Почтаря, представляющая собой актуальное научное исследование в области клинической лабораторной диагностики. Она крайне интересна с научной точки зрения и чрезвычайно востребована с точки зрения практического здравоохранения.

Основные результаты диссертации

Диссертационная работа Евгения Владимировича Почтаря посвящена всестороннему применению метода иммунофенотипирования лимфоцитов у пациентов с диагнозом ХЛЛ. Она охватывает как иммунологические изменения, происходящие в организме пациента до начала терапии и в ходе лечения, дисбаланс в субпопуляциях моноцитов, так и определение диагностической ценности новых маркеров, таких как CD180 и ROR-1, в мониторинге МОБ при ХЛЛ.

Оценка применимости экспрессии ROR-1 и CD180 для мониторинга МОБ при ХЛЛ показала, что экспрессия мембранного рецептора ROR-1 не изменялась, независимо от длительности и применяемых схем лечения, что позволяет рекомендовать этот маркер для детекции минимальной остаточной болезни при ХЛЛ. В то время как экспрессия CD180 на В-лимфоцитах отличалась вариабельностью и регистрировалась только у части пациентов, более того доля пациентов, сохраняющих экспрессию CD180 снижалась в ходе терапии. Использование ROR-1 в комбинации с другими моноклональными антителами обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Исследование субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток показало, что у пациентов с первично выявленным ХЛЛ отмечалось достоверное увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов, Т-хелперов, в первую очередь, за счет Т-хелперов памяти, цитотоксических Т-клеток, активированных Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации по сравнению с группой здоровых доноров. У пациентов, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб, были выявлены схожие изменения: значительное увеличение

абсолютного количества Т-лимфоцитов (преимущественно за счет Т-хелперов-памяти), НК-клеток, а также субпопуляций НК-клеток, несмотря на заметное снижение относительного числа Т-лимфоцитов и НК-клеток. Помимо этого, было выявлено достоверное повышение абсолютного числа активированных Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации и регуляторных Т-клеток по сравнению с донорами крови. Также отмечалось значительное увеличение абсолютного числа регуляторных Т-лимфоцитов, субпопуляции TCR $\gamma\delta$ -Т-клеток и НК-клеток. Все это свидетельствует о том, что при ХЛЛ имеются значимые нарушения клеточного и неспецифического иммунитета.

Одновременно с этим автором было показано, что терапия ибрутинибом приводила к восстановлению иммунологического дисбаланса: снижению количества активированных Т-лимфоцитов, наивных Т-хелперов, TCR $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов. Анализ изменений абсолютного числа регуляторных Т-клеток показал положительную динамику их снижения при использовании ибрутиниба, что, косвенно, может свидетельствовать о повышении противоопухолевого ответа.

Анализ субпопуляционного состав моноцитов крови выявил снижение относительного числа классических моноцитов и увеличение неклассических моноцитов у пациентов с ХЛЛ, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб, по сравнению с контрольной группой и другими группами пациентов ХЛЛ вне зависимости от длительности терапии ибрутинибом, а также увеличение процента промежуточных форм моноцитов во всех исследуемых группах по отношению к донорам В тоже время, анализ абсолютных значений субпопуляций моноцитов периферической крови при ХЛЛ не показал достоверных различий ни с контрольной группой, ни между анализируемыми подгруппами пациентов.

Научная новизна и практическая значимость

В работе показано, что экспрессия маркера ROR-1 определяется на 100% опухолевых В-лимфоцитов, в то время как экспрессия маркера CD180

вариабельна и выявлялась в 52% случаев ХЛЛ. Оценка стабильности экспрессии ROR-1 на фоне проводимой терапии, показала, что она не изменяется и может использоваться для определения минимальной остаточной болезни (МОБ).

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 клинико-диагностических лабораториях медицинских организаций.

Автором изучен субпопуляционный состав Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и моноцитов и было показано изменение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток в дебюте заболевания и в ходе лечения различными схемами терапии. Впервые изучен субпопуляционный состав моноцитов у пациентов ХЛЛ и доказано значение использования абсолютных показателей моноцитов в интерпретации результатов.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные автором результаты обоснованы как большим количеством наблюдений (296 пациентов с диагнозом ХЛЛ, 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом и 30 здоровых доноров), так и использованием современных методов клинической лабораторной диагностики. Статистический анализ проведен на высоком уровне. Все это делает полученные результаты и сформулированные на их основании выводы обоснованными, достоверными и значимыми. Для достижения поставленной цели автором выполнен значительный объем исследований. Результаты исследований хорошо систематизированы и тщательно проанализированы. Иллюстративный материал в виде таблиц и рисунков дополняет текстовую информацию в диссертации. Материалы исследований, начиная с 2019 года, представлялись на российских и международной научных конференциях и обсуждались с коллегами и научным сообществом. Цель, поставленная в диссертационной

работе, реализована, сформированные задачи были решены, положения, вынесенные на защиту, полностью обоснованы и являются краеугольным камнем диссертационной работы.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание учёной степени кандидата и доктора наук. Промежуточные результаты были представлены на 4 российских и 1 международной научных конференциях и конгрессах.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 38 рисунков и 17 таблиц. Список литературы состоит из 196 источников, опубликованных вплоть до 2022 года включительно, из которых 41 отечественный и 155 иностранных.

Во введении Евгений Владимирович кратко представляет актуальность проблемы, формулирует цель диссертационной работы и вытекающие из нее 4 задачи, описывает научную новизну, указывает теоретическую и практическую значимость проведенного исследования. Замечаний и комментариев по этой части диссертационной работы не возникло.

В обзоре литературы описываются диагностические критерии постановки диагноза ХЛЛ, согласно 5-му пересмотру классификации Всемирной организации здравоохранения, опубликованному в 2022 году, приводятся эпидемиологические и краткие клинические данные ХЛЛ. Далее автор переходит к подробному описанию структуры, функции маркеров CD180

и ROR-1, оценке МОБ различными методами, сопоставляя достоинства и недостатки каждого из методов. Раздел 1.1 в литературном обзоре завершается выводом, что существует необходимость поиска новых маркеров для оценки МОБ при ХЛЛ. Раздел 1.2 посвящен литературным данным о популяционном составе Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток при ХЛЛ. Проведенный анализ ранее опубликованных работ 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 единичны и противоречивы. Глава хорошо структурирована, написана грамотно, хорошим литературным языком, читается легко и интересно.

В главе «Материалы и методы исследования» Евгением Владимировичем подробно представлена клиническая характеристика больных, включенных в исследование: 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 критерии включения и невключения пациентов в клиническую часть исследования.

Автором указано, что для оценки экспрессии ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах исследованы образцы периферической крови 160 человек, в том числе, 50 с первично выявленным или нелеченым ХЛЛ, 60 пациентов, получавших различные схемы терапии, а также 20 с реактивным лимфоцитозом и 30 образцов крови здоровых доноров.

Для сравнительного исследования двух иммунофенотипических подходов в оценке МОБ было проанализировано 64 образца костного мозга (КМ) и 6 образцов периферической крови пациентов с ХЛЛ. Приводится подробное описание протоколов проведения иммунофенотипирования для оценки МОБ, указаны использованные панели моноклональных антител, процесс выявления (гейтирования) опухолевой популяции клеток. Далее автор описывает технологию 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) и 3-х субпопуляций моноцитов (классические моноциты (CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточные (CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические (CD14⁺CD16⁺⁺)) по экспрессии соответствующих антигенов.

В завершении данной главы Е.В. Почтарь приводит, каким образом проводилась статистическая обработка результатов. Указан широкий арсенал статистических методов обработки данных. Виден высокий методический уровень автора, замечаний по данной главе нет.

В главах №3 «Значение экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 в диагностике и мониторинге терапии при ХЛЛ» и №4 «Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов у пациентов с ХЛЛ в дебюте заболевания и на фоне терапии» приведены результаты собственных исследований и их сравнение с ранее опубликованными литературными данными.

В первом разделе главы 3 «Значение экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 в диагностике и мониторинге терапии при ХЛЛ» Е.В. Почтарь проводит оценку экспрессии антигенов ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах, в ходе которой убедительно 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.

Во втором разделе Главы 3 Евгений Владимирович сравнивает два иммунофенотипических подхода для оценки МОБ при ХЛЛ – традиционный, предложенный группой ERIC (без ROR-1), и с использованием лиофилизированной пробирки типа DURAClone, включающей, среди прочего, моноклональное антитело к ROR-1. При сравнении двух подходов были показаны высокие значения чувствительности (97,4%) и специфичности (87,1%). Кроме того, в ходе анализа данных было показано, что использование в панели антител ROR-1 имеет преимущество, так как позволяет сократить число анализируемых пробирок с двух до одной, а также заменить оценку

легких цепей для определения клональности В-лимфоцитов.

В первом и втором разделах главы 4 оцениваются субпопуляции Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до и в динамике терапии больных ХЛЛ, как в общей группе пациентов, так и в зависимости от наличия/отсутствия делеции del(17p). Подробный анализ субпопуляций лимфоцитов позволил автору прийти к заключению, что при ХЛЛ имеют место существенные нарушения клеточного и неспецифического иммунитета. В то время как del(17p) не влияет на иммунологические изменения.

В третьем разделе главы 4 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 группой здоровых доноров.

В разделе «Заключение» автор еще раз приводит ключевые результаты диссертационной работы. Заключение полностью отражает суть диссертации и не требует изменений. Все 6 выводов диссертационной работы логичны, обоснованы и полностью вытекают из представленных результатов исследования.

В целом представленная диссертация заслуживает положительной оценки. Работа выполнена на современном методическом уровне. Обзор литературы, проведенные исследования, статистический анализ свидетельствуют о хорошей теоретической и методической подготовленности автора. Диссертация оформлена в соответствии с существующими требованиями к научным квалификационным работам на соискание учёной степени доктора наук. Автореферат диссертации изложен на 24 страницах, и полностью отражает основные положения диссертации

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных замечаний по дизайну и существу диссертационного исследования, в том числе по оформлению диссертационной работы и автореферата, нет.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней

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 важную актуальную научную задачу – выявление новых маркеров, остающихся стабильными на фоне проводимой терапии, для диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при ХЛЛ, а также выявление значимых показателей субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов периферической крови в дебюте заболевания и на фоне различных схем терапии ХЛЛ.

По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует пунктам 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением

Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в актуальной редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Почтарь Евгений Владимирович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика».

Официальный оппонент:

Цаур Григорий Анатольевич, доктор медицинских наук (14.00.46 - Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки)), заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница», заведующий лабораторией клеточной терапии онкогематологических заболеваний Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий»

Подпись доктора медицинских наук Цаура Г.А. «заверяю»

Начальник отдела кадров Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница»



Васильева Е.В.

620149 Екатеринбург, улица Серафимы Дерябиной, 32

Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница»

сайт www.odkb.ru

телефон 8-(343) 231-91-09, e-mail odkb-public@mis66.ru

12 января 2024 года