

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по научной работе ФГБОУ ВО
«Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский
университет имени акад. И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
академик РАН д.м.н. профессор



Ю.С. Полушин

«16» января 2024 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Почтара Евгения Владимировича «Экспрессия В-клеточных маркеров ROR-1, CD180 и значения субпопуляций Т-лимфоцитов и натуральных киллеров в оценке течения хронического лимфолейкоза», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Актуальность темы выполненной работы

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.

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – опухоль лимфоидной ткани, характеризующаяся поражением костного мозга, периферической крови и вторичных лимфоидных органов. Некоторые В-клеточные лимфопролиферативные новообразования, такие как, лимфома из клеток мантии, лимфома маргинальной зоны, лимфоплазмочитарная лимфома имеют сходные клиничко-морфологические и фенотипические характеристики, что диктует необходимость поиска новых дифференциально-диагностических маркеров. У

большинства пациентов с ХЛЛ современная терапия приводит к достижению клинической ремиссии, при которой остаточную опухоль невозможно определить инструментальными методами, а также цитологическим и гистологическим исследованием. Использование различных таргетных и химиотерапевтических режимов может формировать химиорефрактерный фенотип опухолевых клеток. Кроме того, мембранная экспрессия диагностических маркеров может снижаться или исчезать в зависимости от применяемых схем лечения.

Несмотря на успехи в лечении ХЛЛ с достижением молекулярной ремиссии, инфекционные заболевания являются частым осложнением течения хронического лимфолейкоза, а у 10-20% пациентов – основной причиной смерти.

Они развиваются вследствие снижения клеточного и гуморального иммунитета в результате опухолевой прогрессии, а также иммуносупрессии, связанной с терапией. В связи с вышеизложенным, изучение субпопуляционного состава Т-, НК-клеток и моноцитов имеет важное значение в оценке клеточного и неспецифического звена иммунитета до начала терапии и в период иммунохимиотерапии.

Таким образом, диссертационная работа Е.В. Почтаря посвящена актуальной теме поиска новых маркеров для оценки МОБ методом иммунофенотипирования и изучению клеточного и неспецифического звена иммунитета до начала терапии и в период иммунохимиотерапии.

Целью исследования является оценка экспрессии В-клеточных маркеров ROR-1, CD180, субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и моноцитов у пациентов с хроническим лимфолейкозом.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Полученные соискателем ученой степени научные данные позволили утверждать, что экспрессия ROR-1 определяется на всех опухолевых В-лимфоцитах, в то время как экспрессия CD180 варьибельна 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 клиничко-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.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, представленных в диссертационной работе

Научно-исследовательская работа выполнена по традиционному плану на высоком методическом уровне, достаточном количестве материала, с хорошо разработанным дизайном, учитывающим требования, предъявляемым к научным исследованиям.

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.

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.

В ходе данного исследования субпопуляционный состав моноцитов крови: классические моноциты (MO1-CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточные (MO2-CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические (MO3-CD14⁺CD16⁺⁺) определялись у пациентов с ХЛЛ как в дебюте заболевания, так и на фоне проводимой терапии.

В главе «Результаты собственных исследований» автор приводит анализ результатов, подробно описывая полученные данные и сопоставляя их с представленными в литературе. Данная глава разделена на пять основных разделов.

В первом разделе данной главы 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 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.

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 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.

В третьем и четвертом разделе оцениваются субпопуляции Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до лечения и в динамике терапии больных хроническим лимфолейкозом. Статистический анализ полученных данных 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 пятом разделе проводится оценка субпопуляционного состава моноцитов периферической крови. В ходе исследования установлено, что отмечается снижение относительного числа классических моноцитов (МО1) и увеличение неклассических моноцитов (МО3) у пациентов ХЛЛ, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб, 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.

В главе «Обсуждения результатов» автор анализирует и обобщает результаты собственных наблюдений в сопоставлении с результатами, полученными в исследованиях других авторов. Подробно рассматривается возможное влияние таргетных препаратов на иммунную систему пациентов с ХЛЛ. Так, например, в 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 исследований, соответствуют цели исследования и поставленным задачам, сформулированы ясно и четко.

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 стандартизованного 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 и доказано значение использования абсолютных показателей в интерпретации результатов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Использование маркера ROR-1 в иммунофенотипической диагностике ХЛЛ, дифференциальной диагностике реактивных и опухолевых лимфоцитозов, а также оценке МОБ может быть рекомендовано, как врачам клинической лабораторной диагностики, специалистам занимающихся проточной цитометрией, так и врачам-гематологам.

Персонализированный подход к изучению состояния клеточного и неспецифического звена иммунитета делает возможным выявление не только изменений в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов до терапии, но и осуществление мониторинга в динамике лечения пациентов с ХЛЛ, что позволяет оценить восстановление иммунологического дисбаланса и прогнозировать развитие инфекционных осложнений

Результаты исследования включены в учебные планы программ подготовки ординаторов, циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей по направлению «Клиническая лабораторная диагностика» на кафедре клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Практическая значимость работы подтверждается тем, что полученные результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность Московского городского гематологического центра ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы.

Печатные работы по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Оценка содержания и оформления диссертации

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 страницах машинописного текста, иллюстрирована 17 таблицами и 38 рисунками. Библиографический указатель включает 196 источников, из которых 41 отечественных и 155 зарубежных авторов.

Во введении обоснована актуальность научного исследования, сформулирована проблема, требующая разрешения.

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, 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.

Во второй главе дана характеристика обследованных групп пациентов и подробное описание лабораторных методов исследования, использованных в научной работе.

Третья глава посвящена оценке результатов исследования, которые были обобщены и проанализированы в главе «Обсуждение результатов». Выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Замечания и вопросы по работе

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

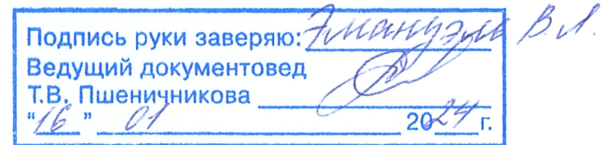
Заключение

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 важную актуальную научную задачу – поиска новых маркеров, остающихся стабильными на фоне проводимой терапии, для диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при ХЛЛ, а также изменения 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, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, представленная работа Почтаря Е.В. соответствует 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.

Настоящий отзыв о научно-практической значимости диссертационной работы Почтаря Евгения Владимировича обсужден и утвержден на заседании кафедры клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации протокол № 201 от «15» января 2024 г.

Заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, академик Метрологической академии
Согласен на обработку персональных данных
д.м.н., профессор
Эмануэль Владимир Леонидович



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8.

Телефон: (812) 338-78-95;

e-mail: info@1spbgmu.ru