

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Александровой Туйары Никоновны на тему «Цитокиновый статус больных хроническим миелолейкозом в различные фазы заболевания», представленную к официальной защите на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови

Актуальность темы диссертационного исследования

Несмотря на то, что этиология хронического миелолейкоза (ХМЛ) до настоящего времени не выяснена, патогенез заболевания достаточно хорошо расшифрован, что позволило создать высокоточную диагностику заболевания, даже в атипичных случаях клинического течения. Разработка и внедрение препаратов таргетной терапии, направленных на устранение молекулярно-генетических основ патогенеза, коренным образом изменило прогноз, превратив ХМЛ из фатальной опухоли крови в хроническое заболевание, не ограничивающее продолжительность жизни у большинства больных. Однако, даже несмотря на возможность использования целого арсенала ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) трех поколений и альтернативных механизмов действия, остается значительная доля пациентов с ХМЛ, имеющая резистентность к нескольким линиям терапии. Необходимость выделения данной группы пациентов в ходе лечения и разработка индивидуализированных схем комбинированной терапии (раннее применение более активных ИТК, комбинация с препаратами для лечения ХМЛ из других фармацевтических групп и механизмов действия, применение трансплантационных технологий), является актуальной задачей.

Гиперплазия кроветворения при миелопролиферативных новообразованиях и, в частности ХМЛ, может сопровождаться патологической выработкой цитокинов, приводящей к вторичному воспалению и изменениям стромы костного мозга. Цитокинами, вовлеченными в этот механизм, являются трансформирующий фактор роста

бета миелоидных предшественников ($TGF-\beta$), ростовой фактор, вырабатываемый тромбоцитами ($PDGFR$) и эндотелиальный сосудистый фактор роста ($VEGF$), которые могут приводить к развитию вторичного миелофиброза, остеосклероза и ангиогенеза [30]. Патологическая выработка цитокинов, хемокинов и металлопротеиназ может участвовать в извращенном межклеточном взаимодействии нейтрофилов, моноцитов и мегакариоцитов, приводя к выходу $CD34+$ миелоидных предшественников и эндотелиальных клеток в периферическую кровь с развитием очагов экстрамедуллярного кроветворения, в первую очередь миелоидной метаплазии селезенки [31-33]. Результатом длительного влияния этих изменений может быть развитие миелофиброза и остеосклероза, взаимодействие опухолевых клеток с клетками стромального микроокружения с избеганием апоптоза и дальнейшей персистенции опухолевого клона на уровне стволовых лейкемических клеток и клеток-предшественников, несмотря на истощение $BCR::ABL$ положительного клона под влиянием ИТК.

Диссертационная работа Александровой Туйары Никоновны на тему «Цитокиновый статус больных хроническим миелолейкозом в различные фазы заболевания» является актуальным исследованием. Результаты исследования позволяют расширить представления об основах патогенеза, развития резистентности к терапии и прогрессирования хронического миелолейкоза. Установлено, что у пациентов с ХМЛ имеется выраженный дисбаланс цитокинов который может оказывать дополнительную стимуляцию мутагенеза, приводящего к прогрессированию заболевания и селекцию резистентного к терапии клона. Выявлено, даже при достижении глубоких молекулярных ответов концентрация отдельных цитокинов у больных ХМЛ остается аномально высокой, что может сохранять возможности молекулярных рецидивов заболевания и являться причиной неудачи использования методики ремиссии без лечения.

Полученные результаты и их обобщение представляют несомненный научный и практический интерес.

Научная новизна исследования

Впервые в данном исследовании проведено комплексное изучение сывороточной концентрации провоспалительных, противовоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IFN- α , VEGF-A) и уровня экспрессии на клетках костного мозга регуляторных молекул клеточного цикла (Ki-67, c-Мус, p53, каспаза 3), а также белка множественной лекарственной устойчивости (p-гликопротеина) в зависимости от фазы заболевания, длительности и эффективности терапии у пациентов с ХМЛ. Показано, что во всех фазах заболевания и даже при достижении глубокого МО на фоне многолетней терапии ИТК наблюдается гиперсекреция как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Установлено, что наиболее интенсивная продукция провоспалительных цитокинов наблюдается при первичной диагностике заболевания и отмечена прямая связь между концентрацией провоспалительных цитокинов и объемом опухолевой нагрузки. Показано, что при неудаче терапии имеет место цитокиновый дисбаланс за счет повышения концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17), фактора роста VEGF-A и снижения концентрации противовоспалительного цитокина IL-10. Впервые выявлена взаимосвязь между высокой концентрацией провоспалительных цитокинов в сыворотке крови пациентов с ХМЛ и низким уровнем экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла p53 и c-Мус, а также гиперэкспрессией белка множественной лекарственной устойчивости p-гликопротеина в клетках костного мозга больных ХМЛ.

Определены биомаркеры, которые могут иметь значение в прогнозе вероятности достижения большого молекулярного ответа (БМО) на терапию ИТК.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в изучении профиля цитокинов и экспрессии регуляторных белков в различных фазах

течения ХМЛ и при различном ответе на таргетную терапию. Установлена взаимосвязь между цитокиновым дисбалансом и уровнем экспрессии белков, регулирующих процессы пролиферации, апоптоза клеток костного мозга и транспорт лекарственных препаратов. Полученные результаты позволяют улучшить понимание роли опухолевого микроокружения в прогрессии ХМЛ и достижениях ответа на терапию.

Результаты проведенного исследования могут быть использованы в практике как прогностические маркеры оценки вероятности эффективности терапии ИТК, в том числе для раннего выявления пациентов с высоким риском неудачи терапии и индивидуализированного подхода к их лечению и мониторингу эффективности терапии.

Оценка уровней концентрации цитокинов IL-1 β , IL-17, VEGF-A дает возможность прогнозировать вероятность успешной отмены терапии ИТВ при наличии глубокого молекулярного ответа.

Таким образом, полученные в работе данные имеют несомненное теоретическое и практическое значение для использования в гематологии.

Обоснованность полученных результатов

Обоснованность полученных результатов и сделанных выводов определяется достаточным количеством пациентов (87 пациентов) группы исследования и группы контроля из 50 практически здоровых лиц, использованием методологии научного исследования (расчет объема выборки, одномоментное поперечное исследование), адекватным выбором методов обследования, включающих клинические, цитогенетические и молекулярно-генетические методы и лечения (ИТК первого и второго поколений) пациентов, выбором методов статистической обработки результатов. Результаты исследования многократно докладывались на российских и международных конференциях и конгрессах. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 5 - в журналах, входящих в перечень

рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки для публикации основных научных результатов диссертаций.

Объем, структура, содержание и оформление диссертационной работы

Диссертация написана в традиционном виде и соответствует требованиям, предъявляемым к оформлению диссертационных работ. Текст изложен на 145 страницах: 117 страниц текста, список литературы на 25 страницах и списка иллюстративного материала. Текст состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, результатов собственных исследований и обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы состоит из 216 литературных источников, в том числе 13 отечественных и 203 иностранных, большинство из которых опубликовано в течение последних десяти лет. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 7 рисунками.

Во введении приведены обоснование актуальности выбранной темы, степень разработанности и темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и теоретическая и практическая значимость работы, методологии и методы диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности, апробация работы, внедрение результатов исследования, публикации, объем и структура работы, личный вклад автора.

В обзоре литературы приведены современные представления о хроническом миелолейкозе, современных принципах терапии больных хроническим миелолейкозом, сведения о лейкемических стволовых клеток и их роль в патогенезе хронического миелолейкоза, роли цитокинов в патогенезе хронического миелолейкоза, регуляции клеточного цикла при хроническом миелолейкозе, роли белка множественной лекарственной устойчивости в развитии резистентности к ингибиторам тирозинкиназ.

В главе «Материал и методы» представлены сведения о дизайне исследования, клинической характеристике исследуемой группы включенных

в исследование, специальных методах исследования, статистических методах исследования. Диссертационная работа представляет собой одномоментное поперечное исследование. Согласно расчетам, объем минимальной выборки составил 85 человек, в исследование было включено 87 больных с различными фазами ХМЛ, наблюдавшихся в гематологическом отделении ГАУ Республики Саха (Якутия) Республиканской больницы № 1 – Национальный центр медицины, г. Якутск и ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 2», г. Новосибирск. Всем больным проводилось клиническое обследование согласно Российским клиническим рекомендациям по диагностике и лечению ХМЛ. Группу контроля составили 50 клинически здоровых лиц со схожим возрастом и распределением по полу. для уточнения цитокинового профиля.

На момент включения в исследование терапия гидроксикарбамидом проводилась 10 (11,5 %) впервые диагностированным больным, терапия иматинибом – 49 (56,3 %), ИТК2 – 26 (29,9 %) больным и цитостатическая терапия 2 (2,3 %) больным с бластным кризом. Ингибиторы тирозинкиназ второго поколения во вторую и последующие линии назначены 26 (29,9 %) больным, из них нилотиниб в 12 (13,8 %), дазатиниб в 10 (11,5 %) и бозутиниб в 4 (4,6 %) случаях. Терапия третьей линии назначена 8 больным (9,2 %), из них в половине случаев – дазатиниб 100 мг (4/4,6 %), другим – бозутиниб 500 мг (4/4,6 %).

Больным и лицам контрольной группы проведено количественное определение концентрации цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IFN- α и VEGF-A в сыворотке крови. Определение экспрессии белков пролиферации (Ki-67), апоптоза (p53), множественной лекарственной устойчивости (p-гликопротеин), эффекторной каспазы 3, онкопротеина c-Myc проведено на цитологических мазках костного мозга, полученных путем аспирационной биопсии.

В главе «Результаты собственных исследований» приведены полученные в ходе исследования данные и их анализ. По результатам исследования установлено, что в общей группе больных ХМЛ наблюдается

повышение секреции как провоспалительных (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18), так и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) и IFN- α по сравнению с группой контроля. Выявлены особенности показателей цитокинового профиля больных на различных этапах и фазах заболевания. В дебюте заболевания выявлена наиболее высокая концентрация провоспалительных цитокинов IL-17, IL-6 и IL-1 β . У пациентов с продвинутыми фазами заболевания наблюдалась статистически значимо более высокая концентрация IL-6. Длительная терапия ИТК (более 12 месяцев) приводила к статистически значимому уменьшению концентрации провоспалительных цитокинов в сыворотке крови (IL-2, IL-1 β и IL-18), однако сохранялись достоверные различия с показателями здоровых лиц. Уровень экспрессии в крови химерного гена *BCR::ABL1* прямо коррелировал с концентрацией в сыворотке крови цитокинов IL-17, IL-1 β и IL-6. Получены статистически значимые корреляционные взаимосвязи между концентрацией отдельных цитокинов в сыворотке крови и уровнем ЛДГ, количеством бластов, базофилов периферической крови, обратная корреляционная связь между IFN- α и количеством бластных клеток периферической крови. Концентрация TNF- α оказалась достоверно ниже у больных, получающих терапию иматинибом, по сравнению с больными, получающими ИТК2 – дазатиниб. Концентрация IFN- α была статистически значимо ниже у лиц, получающих дазатиниб и бозутиниб, по сравнению с пациентами, получающими иматиниб и нилотиниб.

У больных ХМЛ, не достигших БМО, концентрация IL-17 в 7 раз, IL-1 β в 5 раз, VEGF-A в 3,6 раза, IL-2 в 2,6 раза, IL-6 в 1,7 раза превышали таковые у лиц с БМО. Наоборот, у пациентов с БМО концентрация IL-10 была выше, чем у больных без БМО. При ранжировании факторов риска наиболее значимыми предикторами неэффективности терапии явились высокая концентрация IL-17 и IL-1 β . По результатам ROC-анализа выявлены пороговые значения концентраций цитокинов, позволяющие прогнозировать достижение БМО: концентрации IL-1 β более 2,5 пг/мл и IL-17 более 2,6 пг/мл.

При достижении глубокого МО у больных ХМЛ определялись более высокие концентрации цитокинов TNF- α , IL-6, IL-18, IL-10, IFN- α , IL-17 по сравнению с контролем. При достижении МО5.0, концентрация IL-17 снижалась до значений сопоставимых с показателями условно здоровых лиц, что позволяет рассматривать данный показатель для мониторинга безопасности отмены терапии ИТК, концентрации провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, IL-18 и провоспалительного цитокина IL-10 у больных с МО5.0 оставались достоверно более высокими по сравнению со здоровыми лицами.

Проведен сравнительный анализ медиан уровня экспрессии в костном мозге регуляторных молекул среди больных ХМЛ в дебюте заболевания, с БМО, без БМО и продвинутыми фазами заболевания. Пациенты в дебюте ХМЛ по сравнению с больными с БМО и без БМО характеризовались достоверно более высоким уровнем экспрессии с-Мус, у 74,5 % впервые диагностированных больных ХМЛ уровень экспрессии с-тус не превышал 25 % [50, 146, 148]. Зафиксирован низкий уровень пролиферативной активности, выражаемой маркером Ki-67, по сравнению с больными в ХФ с более длительным периодом наблюдения (как с БМО, так и без БМО). При сравнении пролиферативной активности клеток костного мозга больных в зависимости от молекулярного ответа статистически значимых различий получено не было. Не было получено достоверных различий по частоте достижения БМО между группами больных с низким, средним и высоким уровнем экспрессии Ki-67. Больные в ХФ, не достигшие БМО, по сравнению с больными с БМО характеризовались достоверно более высоким уровнем экспрессии каспазы-3, но более низким уровнем с-Мус и p53. Для больных в ФА и БК ХМЛ были характерны статистически значимо высокие уровни экспрессии Ki-67, с-Мус, каспазы-3 по сравнению с другими анализируемыми группами и статистически значимо высокий уровень экспрессии p53 по сравнению с больными в ХФ без БМО и с БМО. У всех больных с высоким уровнем экспрессии каспазы-3 и с-Мус (> 50 %) отсутствовал эффект от

терапии ИТК. Значимым предиктором неэффективности ИТК являлся уровень экспрессии белка p53 и онкопротеин с-мус. Эффективность терапии ИТК в исследуемой когорте также зависела от экспрессии в костном мозге белка множественной лекарственной устойчивости р-гликопротеина, у больных с неудачей терапии уровень экспрессии р-гликопротеина превышал таковую больных с БМО в 2 раза.

Достижение БМО можно прогнозировать при экспрессии р-гликопротеина менее чем в 20 % клеток костного мозга. У пациентов, получающих терапию дазатинибом, уровень экспрессии р-гликопротеина был выше по сравнению с больными, получающими нилотиниб и иматиниб. Отсутствие и/или минимальная экспрессия белков p53 (менее 4 %) и с-Мус (менее 6 %), а также гиперэкспрессия белка множественной лекарственной устойчивости р-гликопротеина (более 20 %) в костном мозге больных ХМЛ сопряжены с риском неэффективности таргетной терапии.

Цитокиновый дисбаланс, наблюдаемый у больных ХМЛ, коррелирует с уровнем экспрессии в костном мозге белков, регулирующих процессы пролиферации (Ki-67, с-Мус), апоптоза (p53, каспазы-3). Наличие корреляционных связей между провоспалительными цитокинами, концентрация которых была статистически значимо выше у больных ХМЛ без БМО (IL-1 β , IL-17), и белками p53, с-Мус, р-гликопротеин.

В главе «Обсуждение» автор проводит сравнение полученных результатов с литературными данными, показывая их сходство и новую информацию, полученную в ходе исследования, имеющую теоретическую и практическую значимость.

Заключение, выводы и практические рекомендации следуют из полученных результатов и сделаны на их основе.

Достоверность результатов и обоснованность выводов

Результаты диссертации, положения, выносимые на защиту и выводы являются релевантными ввиду достаточной репрезентативности выборки

пациентов: 87 больных ХМЛ и 50 практически здоровых лиц, использованием корректной методологии научного исследования, проведением полноценного обследования, включающего высокотехнологичные методы диагностики; качественной обработки полученных результатов с использованием адекватных методов биостатистики. В тексте диссертации содержится большое количество данных, полученных в ходе исследования. В ходе работы задачи исследования решены, цель достигнута.

Полученные в работе выводы достоверны, отражают результаты проведенных исследований, четко сформулированы.

Положения, выносимые на защиту, подтверждены полученными результатами и вытекают из цели и задач исследования.

Замечания по диссертационной работе.

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Имеются отдельные стилистические погрешности в написании текста, единичные орфографические ошибки, использование обозначения критерия р одновременно в виде строчной и прописной буквы. В обзоре литературы, несмотря на тщательное описание роли цитокинов и клеточного цикла в патогенезе ХМЛ в разделе, посвященном современным принципам терапии и ингибиторам тирозинкиназ приведена только описание иматиниба, нилотиниба, понатиниба и асциминиба. Отсутствуют характеристики дазатиниба или бозутиниба, хотя в исследование включены пациенты получавшие терапию этими препаратами, тогда как понатиниб и асциминиб в группе исследования не получал ни один пациент. Некорректно указана очередность линий терапии иматиниб-нилотиниб-понатиниб. Большое количество результатов исследования приведено в рисунках и таблицах, некоторые из которых излишни и не вносят дополнительной к тексту информации. Выявленные недостатки не носят принципиального характера и не снижают общей ценности работы.

В ходе работы с диссертацией возникли вопросы, на которые хотелось бы получить пояснения:

1. В исследование участвовали пациенты с диагнозом ХМЛ и практически здоровые лица, составлявшие контрольную группу. Распределение по полу и возрасту на первый взгляд было схожим. Проводился ли статистический анализ значимости различий этих показателей между группами исследования.
2. В перечень обязательных исследований при обследовании пациентов с продвинутыми стадиями хронического миелолейкоза в дебюте заболевания и перед переводом на следующие линии терапии включено определение мутационного статуса гена *BCR::ABL*, в тексте диссертации эти результаты не приведены. Поясните, пожалуйста, проводились ли эти исследования и были ли какие-либо отличия в цитокиновом профиле у пациентов с мутациями *BCR::ABL*, что можно предположить так как наличие мутаций позволяет персистировать клону опухолевых клеток на фоне терапии ингибиторами тирозинкиназ.
3. Какие конкретно дополнительные хромосомные аномалии выявлялись у пациентов, включенных в исследование, они были обнаружены в Ph⁺ или Ph⁻ клетках?
4. Известно об иммуномодулирующем действии дазатиниба, определяющего относительные противопоказания к его назначению при наличии аутоиммунной патологии, и отдельные побочные эффекты, например появление больших гранулярных лимфоцитов. Имелись ли какие-либо отличия в цитокиновом профиле у пациентов, получавших дазатиниб от других больных группы исследования.
5. При анализе данных, полученных в ходе исследования неоднократно применялся ROC-анализ с определением пороговых характеристик, имеющих клиническое значение. Общепринятой методологией разработки такого рода моделей является использование двух несвязанных выборок пациентов: обучающей и валидирующей.

Проводилась ли в Вашем исследовании или вне его рамок, валидация моделей, разработанных в ходе исследования.

6. В практических рекомендациях Вы указываете цитокины (IL-1 β , IL-17 и VEGF-A), определение уровня которых целесообразно для прогнозирования вероятности достижения большого молекулярного ответа и успешности использования методики ремиссии без лечения. В первой рекомендации Вы также рекомендуете исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови больных в качестве определения риска неблагоприятного течения заболевания и неудачи терапии ингибиторами тирозинкиназ, однако конкретного перечня цитокинов для этой цели Вы не приводите, перечислите наиболее информативные для этой цели, по Вашему мнению показатели.

Заключение

Диссертация Александровой Туйары Никоновны на тему «Цитокиновый статус больных хроническим миелолейкозом в различные фазы заболевания», представленную к официальной защите на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови является законченной научно-квалификационной работой, в которой проведено изучение уровней провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови выраженностью экспрессии основных регуляторных молекул в клетках костного мозга у больных хроническим миелолейкозом в различные фазы заболевания и с различной эффективностью терапии хронического миелолейкоза, в том числе и при использовании методики ремиссии без лечения. Предложены новые маркеры прогноза течения заболевания, эффективности таргетной терапии и успешности её отмены, которые имеют существенное значение для развития гематологии в стране.

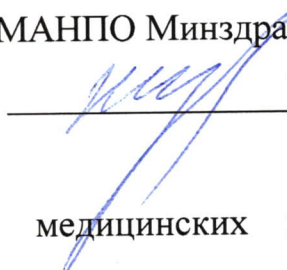
По своей актуальности, научной новизне и практической значимости, объему и достоверности полученных результатов диссертационная работа

Александровой Туйары Никоновны на тему «Цитокиновый статус больных хроническим миелолейкозом в различные фазы заболевания» полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168, от 26.05.2020 г. №751), в части требований, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук

заведующий клинико-диагностическим отделением гематологии и химиотерапии с дневным стационаром ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России профессор кафедры гематологии и трансфузиологии имени академиков И.А. Кассирского и А.И. Воробьева ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

 В.А. Шуваев

24.11.2023 г.

Шуваев Василий Анатольевич - доктор медицинских наук (шифр специальности 14.00.06 – 3.1.28. гематология и переливание крови), заведующий клинико-диагностическим отделением гематологии и химиотерапии с дневным стационаром ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России профессор кафедры гематологии и трансфузиологии имени академиков И.А. Кассирского и А.И. Воробьева ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Адрес: 191024, г. Санкт-Петербург, 2-ая Советская ул. д. 16

Телефон: +7(812) 3097981

E-mail: shuvaev77@mail.ru

Подпись Шуваева В.А. заверяю

ФГБУ РосНИИГТ ФМБА
СПЕЦИАЛИСТ
ПО КАДРАМ
ЛЕДНЕВА Е. Ю.

