

Отзыв

официального оппонента – доктора медицинских наук, профессора кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России Семочкина Сергея Вячеславовича на диссертационную работу Смирновой Светланы Юрьевны на тему «Клональные реаранжировки генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и генов Т-клеточного рецептора у пациентов с заболеваниями системы крови», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «Гематология и переливание крови» (14.01.21).

Актуальность темы исследования

Согласно современным представлениям гемобластозы имеют клональную природу, то есть происходят из общей клетки-предшественницы, получившей в результате малигнизации способность к неограниченному делению. Выявление клональности в определенной ткани методами молекулярной диагностики дает ценную дополнительную информацию, которая может применяться для дифференциальной диагностики заболеваний кроветворной системы, а также для оценки эффективности терапии и отслеживания ранних рецидивов.

С одной стороны методы определения клональности лимфоцитов на сегодняшний день вошли в рутинную лабораторную практику диагностики злокачественных заболеваний кроветворной системы, с другой стороны клональная экспансия является частью нормального процесса формирования иммунного ответа. Известно, что в крови здоровых людей существуют

подчас очень большие клоны Т-лимфоцитов, которые отражают, например, перенесенные вирусные инфекции или аутоиммунные реакции. По всей видимости, не всегда обнаружение клональности свидетельствует о наличие злокачественного процесса.

Данная работа посвящена изучению взаимосвязей Т- и В-клеточной клональности со злокачественным процессом и определению диагностической ценности данного биологического события. В работе проведен анализ клональных реаранжировок генов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов у больных различными заболеваниями системы кроветворения, а также в группе здоровых доноров и у пациентов с аутоиммунными негематологическими заболеваниями. Была поставлена цель проанализировать случаи возникновения сочетанной Т- и В-лимфоцитарной клональности и установить является ли она результатом истинной перестройки локусов Т-клеточного рецептора и иммуноглобулинов или является результатом клональной пролиферации доброкачественных лимфоцитарных клонов, которая может иметь как реактивную природу, так и вовсе не иметь отношения к заболеванию.

Таким образом, актуальность диссертационной работы Смирновой Светланы Юрьевны, посвящённой оценке клональные реаранжировки генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и генов Т-клеточного рецептора у пациентов с гемобластозами и аутоиммунными заболеваниями не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Цель и задачи данной работы обоснованы изучением достаточного объема научной литературы, большой выборки экспериментального материала, и носят конкретный характер. В качестве объекта исследования диссертантом были использованы образцы периферической крови,

поступившие в лабораторию молекулярной гематологии ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России для определения клональности за десятилетний период с 2008 по 2017 год. Всего проанализировано 2182 пациентов. По мимо этого этапа работы ретроспективно собраны данные по пациентам с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) участвующим в исследовании ОЛЛ-2009, пациентам с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой (АИТЛ), пациентам с неопухолевыми аутоиммунными заболеваниями и здоровым людям. В ходе выполнения диссертационной работы использовались современные методы исследования и статистического анализа.

Новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Впервые на крупной выборке пациентов с различными гематологическими и негематологическими заболеваниями, а также на клеточном материале здоровых доноров была изучена клональная гетерогенность и подробно охарактеризована категория реактивной клональностип. В 49 случаях автором было выявлено возможное сочетание четкой Т- и В-клеточной клональности, что чаще наблюдалась у больных с ОЛЛ, аутоиммунной гемолитической анемией и АИТЛ.

Одним из оригинальных решений, выполненных диссертантом, стало изучение клональности в предварительно разделенных лимфоцитарных популяциях CD19+, CD8+, CD4+ и CD3+ клетках, что позволило разработать практические рекомендации для интерпретации данных в сложных диагностических случаях.

Ценность для науки и практики

Важнейшее достоинство работы в том, что впервые был применен метод иммуномагнитной сепарации конкретных популяций лимфоцитов перед оценкой клональности, что позволило подтвердить, что далеко не все случаи клональности свидетельствуют о злокачественном процессе.

Показано, что почти у половины пациентов с АИГА выявляются Т-клеточные клоны, которые относятся к CD8+ популяции лимфоцитов и имеют реактивную природу. Т-клеточная клональность выявляется также при ревматологических заболеваниях и у здоровых лиц.

Кроме того, в работе исследовался клиренс МОБ методом ПЦР с подбором пациент-специфичных праймеров и было подтверждено, что данный метод является надежным для оценки эффективности терапии. Также было показано, что у значительной части пациентов с рецидивом ОЛЛ клональные реаранжировки изменяются, что является следствием изначальной гетерогенности опухоли и наличия минорных клонов. При этом при рецидиве сохраняется хотя бы один из клональных маркеров, выявленных в дебюте заболевания.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, 7 из которых – в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Основные положения диссертации представлены в материалах и докладах Российских и международных научных конференций.

Структура, содержание и оценка диссертационной работы

Диссертация построена по общепринятому плану, изложена на 145 страницах и содержит разделы: «Оглавление», «Список сокращений», «Введение», 3 главы, включающих в себя обзор литературы, главу «Материалы и методы», главу «Результаты исследования и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Приложения» «Практические рекомендации» и «Список литературы. Работа иллюстрирована достаточным количеством таблиц (17) и рисунков (20), содержит приложение (6 таблиц).

Во введении диссертантом представлены актуальность проблемы, цель и задачи работы, охарактеризована научная новизна и практическая значимость проведенного исследования.

В обзоре литературы изложены наиболее важные аспекты, касающиеся структуры Т-клеточных рецепторов (TCR) и молекул иммуноглобулинов, перестроек генов ТКГ и генов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Представлены данные по применению ПЦР и фрагментного анализа для целей определения Т- и В-клеточной клональности. Отдельным разделом обобщаются известные сведения по диагностической ценности выявления клональности и контроля остаточной болезни при отдельных заболеваниях. Анализ литературных данных, выполненный диссертантом, подтверждает актуальность текущего исследования.

В главе 2, представлена характеристика больных и группы контроля, включенных в диссертационное исследование. Описываются технологии выделения ДНК из «живого» и архивного биопсийного материала. Описывается технология проведения ПЦР и интерпретация получаемых результатов. Лабораторная часть включает также описание иммуномагнитной сепарации отдельных групп лимфоцитов. Объем материала, на котором выполнена работа, достаточен для получения достоверных выводов. Лабораторная часть построена логично. Приведены методы исследования и методика определения минимальной остаточной популяции опухолевых клеток. Для анализа данных применены стандартные методы статистики.

Анализ полученных автором результатов подробно изложен в 3-й главе. На основании анализа 2182 проб было установлено, что у 121 пациента одновременно присутствовали признаки Т- и В-клональности, в том числе четкие у 49 человек. В 32% случаев четная В-клеточная клональность

сочеталась с сомнительными или олигоклональными результатами Т-клональности при В-, но Т-НХЛ. Таким образом доказано, что В-клеточная клональность является мощным диагностическим критерием подтверждения наличия В-НХЛ в отличии от Т-клеточной клональности при Т-НХЛ.

При В-линейных вариантах ОЛЛ чаще выявлялись реаранжировки генов гамма цепи TCR (70%) и генов тяжелой цепи IG (78%). У пациентов с Т-линейным ОЛЛ чаще встречались перестройки TCR. Автором сделан вывод, что в случае ОЛЛ наличие Т- или В-клональности не позволяет судить об иммунологическом варианте болезни, что следует учитывать при оценке минимальной остаточной болезни (МОБ). После двух курсов консолидации по протоколу ОЛЛ-2009 выявлялась МОБ у 34,7% пациентов, что было оценено с помощью пациент-специфических праймеров.

В дебюте заболевания почти у всех пациентов (26/28) с АИТЛ выявлялось поражение костного мозга на основании изучения Т-клеточной клональности.

Работа содержит актуальные данные и написана хорошим научным языком. Поставленная в работе задача была успешно решена диссертантом. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные. Полученные автором результаты будет полезны врачам лабораторной диагностики и клиницистам при дифференциальной диагностике заболеваний кроветворной системы.

Заключение

Диссертация Смирновой Светланы Юрьевны на тему «Клональные реаранжировки генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и генов Т-клеточного рецептора у пациентов с заболеваниями системы крови», выполненная под руководством д.м.н. Паровичниковой Е.Н. и д.б.н. Сударикова А.Б. является завершенной научно-квалификационной работой, в которой приводится решение актуальной научно-практической задачи,

имеющей существенное значение для гематологии. Диссертация полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года, с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года №335 и №784 от 02.08.2016 года «О внесении изменений в положение о присуждении ученых степеней», а сам автор, Смирнова Светлана Юрьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук (шифр 14.01.21 – гематология и переливание крови), профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии ПФ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Семочкин С.В.

Подпись Семочкина Сергея Вячеславовича заверяю:

Ученый секретарь ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, д.м.н., доцент



Милушкина О.Ю.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации

117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1, Тел.: +7 (495) 434-03-29, +7 (495) 434-14-22; e-mail: rsmu@rsmu.ru, сайт: www.rsmu.ru