

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Балдуевой Ирины Александровны на диссертацию Кузьмина Юрия Борисовича «Растворимая форма супрессора активации Т-клеток VISTA в сыворотке крови как маркер при новообразованиях костей», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы диссертационного исследования

Взаимодействие иммунной системы со злокачественной опухолью представляет собой тонкий баланс между процессами иммунной активации и иммунной супрессии. Одной из наиболее важных проблем этого взаимодействия является способность злокачественных новообразований разрушать иммунологическую защиту посредством реализации различных молекулярных механизмов. Существует целый ряд стимуляторов и блокаторов иммунного ответа, выявляемых как на опухолевых клетках, так и в их микроокружении. Такие молекулы, как PD-1/PD-L1, LAG-3, TIM-3, VISTA, CD244, CD160 и BTLA, в состоянии определять клеточную судьбу цитотоксических Т-лимфоцитов, подавляя или активизируя локальную иммунную реакцию.

В настоящее время внимание исследователей привлекла VISTA (V-домен Ig, супрессор активации Т-клеток), которая представляет собой новую молекулу «контрольной точки» в семействе B7, уникальным образом влияющую на процесс «ускользания» опухоли от иммунной системы, благодаря характеру экспрессии и функциям. В отличие от «контрольных точек», которые в первую очередь регулируют эффекторную функцию Т-клеток и их истощение, VISTA играет роль в поддержании функции супрессорных клеток миелоидного происхождения, выживания регуляторных Т-клеток, регуляции активации естественных киллеров, ограничении презентации антигена на антиген-презентирующих клетках, в поддержании Т-лимфоцитов в состоянии покоя. Взаимодействие с VISTA может приводить к гибели наивных Т-клеток или к снижению активации сигнальных путей, активируемых Т-клеточным рецептором и их пролиферации. Именно поэтому блокирование VISTA может способствовать увеличению числа Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам, повышению их активации в микроокружении опухоли и его деполяризации.

В связи с этим, в настоящее время в области клинической лабораторной диагностики онкологических заболеваний большое значение придается комплексному изучению клеточных сигнальных систем, отвечающих за ключевые характеристики опухолевого процесса, в том числе, изучению «контрольных точек» иммунитета.

Представленная рукопись диссертации посвящена исследованию количественного содержания растворимой формы sVISTA в сыворотке крови больных первичными злокачественными и пограничными новообразованиями костей как маркера, ассоциированного с основными клиническими и морфологическими характеристиками опухоли и характеризующего прогноз заболевания, что может позволить в будущем использовать этот маркер как важную мишень при разработке новых таргетных противоопухолевых препаратов.

Таким образом, актуальность выбранной темы исследования, ее своевременность и значимость не вызывают сомнения.

Научная новизна проведенного исследования и полученных результатов

Впервые у больных новообразованиями костей проведено комплексное сравнительное иммуноферментное исследование содержания в сыворотке крови sVISTA, рецептора программируемой гибели клеток sPD-1, его лиганда sPD-L1, лиганда sRANKL рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF-κB с учетом их ассоциации с основными клиническими и морфологическими характеристиками заболевания и прогнозом выживаемости.

Автором диссертационного исследования получены новые данные о значимом снижении уровня супрессора активации T клеток VISTA в сыворотке крови больных злокачественными и пограничными новообразованиями костей, при этом концентрация sVISTA не зависела от пола, тогда как у больных саркомами костей была выявлена обратная корреляция между возрастом и количественным содержанием sVISTA в сыворотке крови.

Обнаружена связь сывороточных уровней sVISTA с гистологическим строением злокачественных новообразований костей и степенью их дифференцировки, локализацией опухоли в костях скелета, видом и типом пораженной кости и критериями системы TNM.

Продемонстрированы разнонаправленные изменения уровней растворимых форм белков-мишеней таргетной иммунотерапии sPD-1 и sPDL1, а также лиганда sRANKL рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора NF-κB в периферической крови больных злокачественными и пограничными опухолями костей. В наибольшей степени эти изменения были выражены при пограничной гигантоклеточной опухоли кости и саркоме Юинга, имеющей нейроэктодермальное происхождение.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена тщательной теоретической проработкой проблемы, достаточным объемом изученного материала. Исследование основано на материале 125 обследованных пациентов, у которых впервые были выявлены новообразования костей и которые составили две группы: 1) группа 112 больных злокачественными опухолями (саркомами) костей; 2) группа 13 пациентов с пограничными опухолями костей, представленная гигантоклеточной опухолью. В группу контроля вошли 42 практически здоровых человека соответствующего возраста и пола. Обоснованность выводов подтверждается также применением комплекса современных методов исследований, использованием обработки полученных данных современными методами статистического анализа.

Поставленные диссертантом цель и задачи исследования соответствуют названию работы и её содержанию. Выносимые на защиту положения аргументированы и логично вытекают из материалов диссертации. Выводы диссертационной работы логически обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Научно-практическая и теоретическая значимость диссертационной работы

Научно-практическая значимость диссертационной работы Кузьмина Ю.Б. заключается в том, что автору удалось показать принципиальную возможность использования параметров количественного содержания растворимой формы лиганда sVISTA в периферической крови пациентов с новообразованиями костей для диагностики и прогнозирования течения заболевания.

В диссертационной работе продемонстрировано, что отдаленные результаты лечения больных первичными саркомами костей зависят от гистологического варианта строения опухоли. Имеют место статистически значимые различия в уровнях sVISTA между здоровыми донорами и больными хордовой кости ($p=0,018$), при этом наилучшие показатели 3-летней общей выживаемости отмечены у больных хордовой кости, а неблагоприятный прогноз общей выживаемости был характерен для больных типичной остеосаркомой кости.

Автор выявил, что в качестве дополнительного лабораторного маркера оценки прогноза общей выживаемости первичных больных хрящобразующей типичной хондросаркомой кости следует использовать исходные до лечения уровни растворимой формы супрессора активации Т-клеток sVISTA: концентрации маркера sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл в сыворотке крови

свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе 3-летней общей выживаемости.

Полученные диссертантом данные позволили выделить наиболее эффективные молекулярно-биологические маркеры и их пороговые уровни в предсказании неблагоприятного клинического течения первичных сарком костей. Эти лабораторные данные имеют непосредственное практическое значение, так как позволяют оптимизировать диагностический и лечебный алгоритмы при злокачественных новообразованиях костей с учетом биологических характеристик заболевания, наметить будущие перспективные направления клинико-лабораторных исследований.

Работа Кузьмина Ю.Б. имеет также теоретическую значимость, так как расширяет представления о процессах регуляции активности клеток иммунной системы при злокачественных новообразованиях костей.

Оценка личного вклада соискателя в разработку научной проблемы

Все этапы диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автором самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Автор лично принимал участие в заборе материала, проводил биохимические исследования у больных первичными опухолями костей и здоровых доноров. Диссертантом осуществлены статистическая обработка, анализ и интерпретация собранных материалов, сформулированы выводы и практические рекомендации, оформлена диссертационная работа.

Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом

Диссертация состоит из введения, обзора данных литературы, главы «Материалы и методы исследований», двух глав «Результатов собственных исследований», обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и указателя цитируемой литературы. Общий объем диссертации составляет 138 листов машинописного текста, работа иллюстрирована 30 таблицами и 37 рисунками. Указатель литературы содержит 210 источников, из них 32,8% принадлежит к публикациям последних пяти лет.

Во введении автор обосновывает актуальность выполненного исследования, формулирует цель и ставит задачи, необходимые для ее достижения. Последовательность сформулированных задач, требующих решения, соответствует теме диссертации, а их решение служит основанием достижения цели выполненной работы.

В первой главе «обзор литературы» (28 стр.) автор анализирует экспериментальные и клинические работы по заявленной теме, подробно рассматривает имеющиеся сведения о наиболее часто выявляемых опухолях костей, останавливается на характеристиках «контрольных точек»

иммунитета PD-1/PD-L1 и VISTA, представляет данные о системе RANK/RANKL/OPG при первичных новообразованиях костей, обсуждает основные направления клинических исследований противоопухолевой иммунотерапии. С одной стороны, тщательный анализ современной научной литературы указывает о глубокой проработанности научной проблемы, с другой стороны, огорчает большое количество ошибок и опечаток в тексте, отсутствие согласования в числе и падеже, что затрудняет восприятие рукописи диссертации.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» (16 стр.) описана подробная характеристика клинического материала, а также методы лабораторных исследований, выбранные соискателем для решения задач и достижения цели работы. Объем клинического материала составил: 112 больных злокачественными новообразованиями, 13 пациентов с пограничными (гигантоклеточной) опухолью кости и 42 практически здоровых донора группы контроля. Данного клинического материала более чем достаточно для обстоятельного анализа полученных результатов и сделанных выводов, которые соответствуют цели и задачам диссертации.

Следует отметить тщательность проработки выборки пациентов для научного исследования: дана подробная клиническая характеристика больных, распределение пациентов по гистологическому диагнозу, степени дифференцировки опухоли, ее анатомической локализации в костях скелета, стадии заболевания и классификации TNM.

Для определения концентрации sVISTA, sPD-1, sPD-L1, а также лиганда рецептора-активатора ядерного транскрипционного фактора sRANKL в образцах сыворотки крови пациентов и группы контроля автор диссертации использовал метод иммуноферментного анализа.

Обработка полученной информации осуществлялась на персональном компьютере с использованием программных пакетов для статистического анализа «STATISTICA» и SPSS. Автор использовал инструменты параметрической и непараметрической статистики: тесты Колмогорова-Смирнова, критерий Краскела-Уолесса и Манна-Уитни.

Результаты собственных исследований составляют 42 стр. и представлены двумя главами. В них Ю.Б. Кузьмин приводит подробный анализ полученных данных, а также их роль в оценке общего прогноза заболевания (группа злокачественных новообразований костей).

Автор установил, что у всех обследованных больных злокачественными, пограничными опухолями костей и здоровых доноров (группа контроля) выявлен биомаркер sVISTA в сыворотке крови, при этом медиана концентрации sVISTA была достоверно выше в контроле, чем у больных опухолями костей.

Автором выявлены статистически значимые данные, связанные с уровнем маркера в зависимости от возраста больных опухолями костей. В

группе больных саркомами костей автором обнаружена обратная корреляционная статистически значимая зависимость между возрастом и концентрацией sVISTA в сыворотке крови пациентов.

Автор продемонстрировал, что сывороточные уровни sVISTA статистически значимо связаны с гистологическим строением, локализацией и типом опухоли: наименьшие уровни маркера обнаружены у больных хордомой кости, при опухолях большеберцовой и бедренной костей, крестца, при поражении губчатых костей скелета по сравнению с контролем, наибольшие – у пациентов с саркомой Юинга и злокачественными новообразованиями плечевой кости. Также были выявлены статистически значимо низкие концентрации sVISTA в сыворотке крови больных злокачественными опухолями костей при Ib стадии, при критерии T2 и степени дифференцировки опухоли G2 по сравнению с контролем.

Особый интерес в работе диссертанта представляет анализ связи уровней sVISTA с основными компонентами «контрольной точки» иммунитета PD-1/PD-L1, а именно растворимыми формами рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1. В результате исследования автор выявил, что концентрации sVISTA не были связаны с уровнями sPD-L1 и sRANKL. Однако удалось установить, что указанная зависимость усиливалась у пациентов в возрасте старше 40 лет в группах больных саркомой Юинга и хордомой кости при поражении губчатых костей, крестца и ребер.

Анализ выживаемости пациентов с новообразованиями костей показал, что отдаленные результаты лечения больных саркомами костей определяются преимущественно морфологическим вариантом опухоли: наилучшая 3-летняя выживаемость отмечена при хрящобразующих опухолях – хордоме (100%) и типичной хондросаркоме ($76,3 \pm 12,7\%$), а наихудшая – при костеобразующей типичной остеосаркоме ($34,5 \pm 11,8\%$). Наиболее низкие показатели 3-летней общей выживаемости обнаружены при локализации опухоли в костях таза и нижних конечностей

При анализе отдаленных результатов и сопоставления их с концентрациями биомаркера sVISTA автор установил, что группе больных типичной хондросаркомой кости выявлено статистически значимое снижение отдаленных результатов лечения при концентрациях sVISTA $\leq 1,0$ нг/мл.

В главе «Обсуждение результатов исследования» (13 стр.) имеет место сравнительный анализ совокупности данных, имеющихся в мировой и отечественной литературе, и результатов, полученных автором диссертационного исследования, что дает основания для формирования полноценных выводов.

Семь выводов диссертационной работы хорошо обоснованы полученными данными и соответствуют поставленной цели и задачам.

Диссертационная работа заканчивается практическими рекомендациями, которые могут служить ценным дополнением в инструментах клинико-лабораторной диагностики для уточнения прогноза заболевания у обследованной категории больных.

Материалы диссертации полностью отражены в автореферате и в достаточном количестве опубликованных работ (13 печатных работ по теме диссертации, 4 из них - в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК Основные результаты автор докладывал на пяти научных отечественных конференциях с международным участием.

Обоснованность положений диссертации

Высокая степень статистической значимости и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Выводы и практические рекомендации логичны, актуальны, обоснованы достаточным фактическим материалом, вытекают из полученных данных работы и полностью отражают ее содержание.

Замечания

Принципиальных замечаний по работе не имеется. Научная и практическая важность исследования не вызывает сомнений.

Однако, так как в процессе обсуждения собственных результатов автор не сделал попытки объяснить возможные механизмы наблюдаемых явлений, в плане дискуссии хотелось бы задать несколько вопросов.

1. Какие механизмы могут лежать в основе появления свободной формы VISTA в периферической крови онкологических больных?
2. Какие биологические закономерности могут объяснить феномен низких концентраций sVISTA в сыворотке крови больных с новообразованиями костей?
3. Каким образом присутствие sVISTA в микроокружении опухоли влияет на параметры противоопухолевого иммунитета?

Заключение

Диссертация Кузьмина Юрия Борисовича ««Растворимая форма супрессора активации Т-клеток VISTA в сыворотке крови как маркера при новообразованиях костей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи, направленной на выявление новых биомаркеров, имеющих прогностическое значение при первичных злокачественных опухолях костей, что имеет существенное значение для клинической лабораторной диагностики онкологических заболеваний.

По актуальности избранной темы, поставленным задачам, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Кузьмина Ю.Б. соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Кузьмин Юрий Борисович, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Официальный оппонент
Заведующий научным отделом онкоиммунологии
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России,
доктор медицинских наук

Балдуева И.А.

« 05 » мая 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Адрес: Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68
тел.: +7-(921) 599-44-35
эл.адрес: oncl@rion.spb.ru

Подпись доктора медицинских наук Балдуевой И.А. заверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России,
доктор медицинских наук



Иванцов А.О.