

Отзыв

официального оппонента - доктора медицинских наук, заведующего лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница», ведущего научного сотрудника лаборатории клеточной терапии онкогематологических заболеваний государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий»

Цаура Григория Анатольевича

на диссертационную работу Котовой Екатерины Сергеевны «Полиморфизмы генов *TPMT*, *NUDT15* и особенности метаболизма 6-меркаптопурина у взрослых больных Rh-негативными острыми лимфобластными лейкозами/лимфомами», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28 «Гематология и переливание крови»

Актуальность темы исследования

История изучения фермента тиопурип-S-метилтрансферазы (*TPMT*) началась более 60 лет назад, когда в 1962 г. были проведены первые исследования метаболизма тиопуринов. Специфическая активность *TPMT* была описана Ч. Реми в 1963 г., а спустя 20 лет Л. Вудсон и Р. Вайншильбум выделили и охарактеризовали данный белок. Первоначально он был обнаружен в почках и печени крыс и мышей. Впоследствии было установлено присутствие *TPMT* в большинстве тканей человека, включая сердце, плаценту, поджелудочную железу, а также в эритроцитах. При этом уровень *TPMT* в эритроцитах коррелирует с уровнями в других тканях, в связи с чем, это наиболее удобный и эффективный компартмент для изучения активности фермента и концентрации его метаболитов. Активность фермента напрямую коррелирует с аллельными вариантами гена *TPMT*, которых описано более 30. Генетический полиморфизм *TPMT* является одним из наиболее изученных примеров фармакогенетики. Первый минорный аллель *TPMT* у человека был идентифицирован в 1995 году.

Нудикс гидролаза 15 (нуклеотидтрифосфатдифосфатаза, *NUDT15*) – это фермент, катализирующий гидролиз нуклеотидтрифосфатов в нуклеотиддифосфаты. Хотя субстрат *in vivo* для фермента не до конца ясен, предполагается, что он катализирует превращение таких субстратов, как дГТФ, 6-тио-ГТФ, 6-тио-дГТФ и в меньшей степени дТТФ, дЦТФ и 8-оксо-дГТФ. Недостаточность фермента *NUDT15*, вызванная мутациями в одноименном гене, наследуется по аддитивному типу, при этом степень выраженности фенотипа пропорциональна кумулятивному числу минорных аллелей *NUDT15*. Установлено, что недостаточность фермента *NUDT15* в совокупности с недостаточностью *TPMT* является критическим фактором, способствующим развитию гематологической токсичности, вызванной терапией 6-меркаптопурином.

Существует большое количество национальных и международных рекомендаций по оценке генотипа *TPMT* и *NUDT15*, однако в нашей стране, где для лечения взрослых пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) используется отечественный протокол «ОЛЛ-2016», обладающий более низкой интенсивностью по сравнению с международными аналогами, исследования вклада аллельных вариантов *TPMT* и *NUDT15* в гематологическую и негематологическую токсичность ранее не выполнялись. Ликвидации этих «белых пятен» и посвящена диссертационная работа Екатерины Сергеевны Котовой, представляющая собой актуальное научное исследование в области гематологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Полученные автором результаты обоснованы как большим количеством наблюдений (90 пациентов с ОЛЛ), так и использованием современных методов лабораторной генетики и клинической лабораторной диагностики. 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 международных научных конференциях и обсуждались с коллегами и научным сообществом. Цель, поставленная в диссертационной работе, реализована, сформулированные задачи были решены, положения, вынесенные на защиту, полностью обоснованы и являются краеугольным камнем диссертационной работы.

Достоверность и новизна результатов и научных положений, сформулированных в диссертации

В ходе проведения диссертационной работы Екатериной Сергеевной Котовой были всесторонне изучены как генотипические, так и фенотипические особенности пациентов с генетическими вариантами в *TPMT* и *NUDT15*. Впервые в нашей стране в рамках российского протокола «ОЛЛ-2016» было выполнено сравнение профиля токсичности терапии 6-меркаптопурина и концентраций его метаболитов у взрослых больных Rh-негативными ОЛЛ у пациентов с диким типом аллелей *TPMT* и *NUDT15* и минорными аллельными вариантами в гетерозиготном состоянии при лечении по протоколу ОЛЛ-2016.

Было показано, что определение концентраций метаболитов 6-меркаптопурина может применяться как для прогнозирования развития гепатотоксичности, так и с целью контроля приверженности больного ОЛЛ к лечению.

Достоверность полученных результатов строится на правильной методологии исследования, адекватном статистическом анализе, а также рациональной и взвешенной стратегии оценки полученных результатов.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на

соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в зарубежном журнале. Промежуточные результаты были представлены на 2 российских и 3 международных научных конференциях.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Дополнительно представлены четыре приложения. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста, содержит 8 рисунков и 36 таблиц. Список литературы состоит из 287 источников, опубликованных вплоть до 2022 года включительно, из которых 12 отечественных и 275 иностранных.

Во введении автор кратко указывает на актуальность фармакогенетической оценки токсичности химиотерапевтических протоколов, используемых для лечения пациентов с ОЛЛ, описывает особенности отечественного протокола ОЛЛ-2016, дает краткую характеристику аллельных вариантов генов *TPMT* и *NUDT15* как факторов, ассоциированных с токсичностью терапии 6-меркаптопурином, формулирует цель, задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, формулирует методологию и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов, указывает структуру диссертации. Замечаний и комментариев по этой части диссертационной работы не возникло

В обзоре литературы автор приводит краткое описание цитологических вариантов ОЛЛ в рамках FAB-классификации, а также характеризует цитогенетические и молекулярно-генетические варианты ОЛЛ, включенные в классификацию Всемирной организации здравоохранения 2017 г. В этой же главе описан механизм действия различных химиопрепаратов, используемых в лечении ОЛЛ, сделан акцент на нежелательные (токсические) явления их применения. Детально приведен метаболизм 6-меркаптопурина в организме

человека, показана особая роль ферментов тиопуринометилтрансферазы и нудикс гидролазы 15 в этом процессе. Описаны существующие генетические варианты *TPMT* и *NUDT15*. Глава четко структурирована, написана грамотно, читается легко и интересно.

В главе «Материалы и методы» дана детальная клиническая и лабораторная характеристика 90 больных с ОЛЛ, включённых автором в исследование, приведены особенности расчета и модификации дозы 6-меркаптопурина в ходе терапии по протоколу «ОЛЛ-2016», а также способы оценки токсичности. Подробно описана технология генотипирования аллелей *TPMT* и *NUDT15* методом аллель-специфичной ПЦР с использованием замкнутых нуклеиновых кислот (LNA) и последующей верификаций методом секвенирования по Сэнгеру. Также очень подробно представлено описание методики определения концентраций 6-тиогуаниновых нуклеотидов, 6-метилмеркаптопурина в эритроцитах методом ВЭЖХ. Замечаний по данной главе нет.

В главе «Результаты» автор представляет данные собственных исследований. Описан профиль гематологической токсичности, указано количество геморрагических и инфекционных эпизодов, гепатотоксичности и ряда других нежелательных лекарственных реакций у 90 пациентов с ОЛЛ, включенных в исследование. Показана частота встречаемости гетерозиготного носительства минорных аллелей *TPMT* (11,1%) и *NUDT15* (5,6%) у взрослых пациентов с Ph-негативным ОЛЛ. Не найдено взаимосвязи между аллельными вариантами *TPMT* и *NUDT15* и лабораторными показателями, характеризующими гематологическую токсичность, а также гепатотоксичность, за исключением второй фазы индукции, когда у пациентов с минорными аллелями *TPMT* и *NUDT15* чаще выявлялось повышение АЛТ, и консолидации II, когда регистрировалось большее количество трансфузий компонентов крови. Длительность миелотоксического агранулоцитоза в консолидации V была достоверно выше у пациентов с минорными аллелями *TPMT* и *NUDT15*. При оценке концентрации метаболитов 6-меркаптопурина показано, что у группы больных с диким типом *TPMT* концентрация 6-метилмеркаптопурина была достоверно выше по сравнению с группой больных с

минорными аллелями этого гена. Оценка прогностического значения аллельных вариантов генов *TPMT* и *NUDT15* показала, что двухлетняя безрецидивная выживаемость у больных минорными аллелями *TPMT*, *NUDT15* была ниже, чем у больных без них 53% и 77 %, соответственно. Автор подчеркивает, что в многофакторном анализе роль минорных аллелей генов *TPMT* и *NUDT15* нивелируется другими прогностическим факторами. В разделе «Обсуждение» Екатерина Сергеевна сравнивает полученные в ходе работы собственные результаты с ранее опубликованными данными и делает вывод, что полиморфизмы *TPMT*, *NUDT15* гетерозиготном состоянии не оказывают влияния ни на токсичность терапии, ни на долгосрочный прогноз ОЛЛ при лечении по протоколу «ОЛЛ-2016».

В разделе «Заключение» автор еще раз приводит ключевые результаты диссертационной работы. Заключение полностью отражает суть диссертации и не требует изменений. Все шесть 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 кандидат наук. Автореферат диссертации изложен на 24 страницах, и полностью отражает основные положения диссертации.

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

Диссертационная работа Котовой Екатерины Сергеевны на тему «Полиморфизмы генов *TPMT*, *NUDT15* и особенности метаболизма 6-меркаптопурина у взрослых больных Ph-негативными острыми лимфобластными лейкозами/лимфомами», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28 «Гематология и переливание крови»

является завершенной научно-квалификационной работой. 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 (с изменениями и дополнениями в редакции от 26 января 2023 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Котова Екатерина Сергеевна, достойна присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28 «Гематология и переливание крови».

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница», ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной терапии онкогематологических заболеваний Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», доктор медицинских наук

Цаур Г.А.

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

02 мая 2023 года

