

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Новик Алексея Викторовича на диссертационную работу Масленникова Владимира Валерьевича на тему «Клинико-лабораторное значение экспрессии PD-L1 в опухоли, sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком» по специальности 3.3.8 клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы выполненной работы

Колоректальный рак и его лечение представляет собой важную проблему в современной онкологии. Являясь одной из наиболее частых злокачественных опухолей, он уже с ранних стадий требует применения методов системной терапии. Несмотря на комплексные подходы к терапии этого заболевания и очевидные успехи в его лечении, для многих пациентов это заболевание остается неизлечимым.

Прорывные успехи, достигнутые в онкологии благодаря исследованиям, направленным на понимание работы иммунного синапса и открытие революционных эффектов по ингибированию оси PD-1/PD-L1, лишь в малой степени коснулись пациентов с колоректальным раком. Сигнальная система PD-1/PD-L1 обладает одновременно двойственным эффектом на иммунные клетки: с одной стороны – стимулирует апоптоз антиген-специфичных Т-клеток, а с другой – подавляет апоптоз регуляторных, супрессорных Т-клеток. Это используется опухолью для «ускользания» от иммунного ответа. Таким образом, понимание механизмов регуляции, связанных с данным сигнальным путем, и их места в патогенезе колоректального рака, являются чрезвычайно актуальными. Диссертационная работа В.В. Масленникова посвящена клинической лабораторной диагностике по определению клинико-лабораторной значимости экспрессии PD-L1 в опухоли и растворимых форм

рецептора программируемой гибели клеток sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком, отражающими клинические аспекты указанной проблемы, что делает работу весьма актуальной для современной онкологии. Исследования ассоциации sPD-1 и sPD-L1 с экспрессией PD-L1 в опухоли больных колоректальным раком малочисленны и неоднозначны. Это связано с значительным количеством вопросов, находящихся как в лабораторной, так и в клинической плоскости и требующих значительных методологических усилий по стандартизации и валидации метода. Автор настоящей диссертационной работы Масленников В.В. имеет большой практический опыт по исследованию растворимых форм sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови и экспрессии PD-L1 в опухоли больных колоректальным раком, который позволил выполнить исследование с использованием современных высокочувствительных иммуноферментных методов определения сывороточных уровней sPD-1, sPD-L1 и общепринятого стандартного эпитопа антител к PD-L1 для оценки экспрессии лиганда в первичной опухоли больных раком толстой кишки на большом числе наблюдений.

Таким образом, актуальность и своевременность выбранной темы исследования не вызывают сомнений.

Новизна исследования и полученных результатов

Автором впервые одновременно проведена комплексная оценка уровней экспрессии PD-L1 в первичной опухоли и иммуноферментный анализ концентрации растворимых форм рецептора программируемой гибели клеток PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком в различных стадиях опухолевого процесса с учетом основных клинических и морфологических характеристик заболевания.

Показано, у что здоровых людей (группа контроля) медианы концентрации sPD-1 и sPD-L1 статистически значимо выше, чем у больных колоректальным раком. При этом не выявлено различий в концентрациях sPD-1 и sPD-L1 при доброкачественных и злокачественных опухолях толстой кишки.

Обнаружено, что концентрация sPD-L1 ассоциированы с полом здоровых и больных колоректальным раком пациентов. Они ниже у женщин по сравнению с мужчинами независимо от характера выявленной опухоли. Выявлена положительная умеренная прямая корреляционная связь уровней рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в сыворотке крови с возрастом больных колоректальным раком.

Диссертант не выявил связи исходных концентраций исследованных маркеров с типом морфологического строения опухоли, степенью ее дифференцировки и локализацией в толстой кишке. Обнаружено статистически значимое повышение медианы sPD-L1, но не sPD-1, при увеличении критерия T и при наличии метастазов.

Коэффициент соотношения sPD-1/sPD-L1 не различался между здоровыми и больными опухолями толстой кишки всех групп. Однако выявлено статистически значимое снижение медианы коэффициента PD-1/PD-L1 с уменьшением степени дифференцировки колоректального рака.

Также при колоректальном раке обнаружена прямая корреляционная ассоциация между концентрациями sPD-1 и sPD-L1, которая ослабевала до незначимой величины при G-3, T4, N2, M1. В группе больных доброкачественными опухолями толстой кишки такая зависимость отсутствовала.

Иммуногистохимический анализ выявил экспрессию PD-L1 в 26% клеток опухоли больных колоректальным раком, уровни которой ассоциировали только со стадией новообразования. Высокая степень экспрессии PD-L1 в клетках стромы колоректального рака обнаружена в 29%

образцов, низкая - в 35% и не коррелировала с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания, за исключением стадии опухолевого процесса.

Не обнаружили ассоциации сывороточных показателей sPD-1, sPD-L1 с уровнями экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и стромы больных колоректальным раком.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для теории и практики

Показанная связь исследованных лабораторных биохимических маркеров sPD-1, sPD-L1 со стадией заболевания позволяет продолжить их изучение в качестве прогностических и, возможно, предиктивных маркеров у больных колоректальным раком. Однако изученные биомаркеры sPD-1 и sPD-L1 не могут быть использованы в качестве тестов дифференциальной диагностики между доброкачественными и злокачественными новообразованиями.

Анализ уровней сывороточных sPD-1 и sPD-L1 с клиническими и морфологическими характеристиками опухолей толстой кишки позволяет диссертанту сделать заключение о связи sPD-L1 с агрессивным биологическим потенциалом колоректального рака, а именно, с основными критериями распространенности опухолевого процесса согласно международной системе TNM и отдаленными результатами лечения.

В ходе однофакторного анализа выживаемости больных обнаружено, что у больных колоректальным раком с сывороточными уровнями sPD-L1 $\geq 9,6$ пг/мл наблюдается ухудшение показателей выживаемости. Данная находка может являться основанием для дальнейшего изучения фактора в качестве дополнительного прогностического и предиктивного маркера у больных колоректальным раком. При подтверждении полученных результатов

содержание растворимых форм рецептора PD-1 и его лиганда PD-L1 в сыворотке крови больных может быть использовано для персонализации лекарственного лечения больных колоректальным раком.

По теме диссертационной работы опубликованы 7 научных работ (из них 3 - статьи в научных изданиях, входящих в перечень изданий, рецензируемых ВАК). Следует отметить, что все из представленных публикаций имеют непосредственное отношение к теме диссертационного исследования. Результаты работы были доложены на отечественных и международных конференциях.

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую практику лаборатории клинико-диагностической централизованного научно-клинического лабораторного отдела консультативно-диагностического центра НИИ клинической онкологии им. академика РАМН и РАН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Материалы диссертации используются на лекционных, семинарских занятиях с курсантами циклов повышения квалификации врачей на кафедре клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Российский университет медицины».

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

Степень обоснованности и достоверности результатов, представленных в диссертации В.В. Масленникова, определяются достаточным объемом проведенных лабораторных исследований у 160 больных опухолями толстой кишки, из них 15 с доброкачественными новообразованиями и 145 пациентов – с колоректальным раком.

Статистический анализ, выполнен с применением корректных методов, что подтверждает достоверность полученных результатов. Интерпретация и

обсуждение результатов исследования проводились на основании изучения 172 отечественных и зарубежных источников. Положения и выводы диссертации непосредственно вытекают из полученных данных.

Автор непосредственно проводил все лабораторные исследования, формулировал цель, задачи исследования и практические рекомендации, проводил оценку и интерпретировал полученные результаты, оформил диссертационную работу.

Оценка содержания и завершенности работы

Диссертационная работа представлена на 125 страницах машинописного текста, состоит из оглавления, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и библиографического списка (включает 41 отечественных и 147 зарубежных источников). Работа написана хорошим литературным языком, результаты представлены последовательно и иллюстрированы 32 рисунками и 20 таблицами.

Во **введении** обоснована значимость диссертационной работы, четко определена цель и обозначены задачи исследования. Изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы содержит анализ имеющихся данных об изменениях системы секреции ключевых компонентов контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 у онкологических больных, в том числе и при колоректальном раке. Целенаправленно указаны многие биологические факторы, влияющие в норме и при развитии онкологических заболеваний на продукцию растворимых форм рецептора программируемой гибели клеток sPD-1 и его лиганда sPD-L1, а также экспрессию PD-L1 в опухолях на разных этапах

прогрессии опухолевого процесса и их связи с основными клиническими и морфологическими характеристиками колоректального рака.

Глава 2 «Материал и методы исследования» включает клиническую характеристику пациентов, описание дизайна исследования, содержит критерии включения и критерии исключения из исследования. В главе подробно описаны клинические и лабораторные методы исследования. Статистическая обработка материала диссертации проведена с использованием современных компьютерных программ, статистические методы подобраны в соответствии с задачами исследования и характеристиками анализируемого материала.

В главе 3 изложены полученные автором результаты. Прежде всего следует отметить выявленные более низкие значения sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови общей группы обследованных больных опухолями толстой кишки в сравнении с группой контроля. При этом, не установлено различий в уровнях обоих белков (sPD-1, sPD-L1) у больных доброкачественными новообразованиями толстой кишки и колоректальным раком.

Диссертант выявил, что концентрации sPD-L1 в сыворотке крови обследованных женщин ниже, как в группе контроля, так и в группах пациенток независимо от характера выявленного новообразования. Также показал, что у мужчин различия медиан sPD-1 в контроле и у больных опухолями толстой кишки были более выраженными, чем в группе обследованных женщин. При этом у мужчин чувствительность порогового значения sPD-L1 <10 пг/мл (верхняя квартиль в контроле) равнялась 59,0% при специфичности 66,7%, а у женщин чувствительность и специфичность этого теста равнялись 79,2% и 33,3%. Такую же закономерность наблюдали и для концентраций sPD-1, однако различия не были статистически значимыми. Указанные данные подтверждают сделанный вывод о том, что sPD-1 и sPD-L1 не обладают диагностической ценностью при новообразованиях толстой кишки, что также подтвердил ROC-анализ.

В работе показано, что концентрации sPD-1 и sPD-L1 связаны с возрастом обследованных трех групп, однако характеризуются слабой прямой корреляционной зависимостью.

Особый интерес представлял анализ исследованных маркеров с учетом гистологического строения опухоли и показателей системы TNM. Диссертант выявил, что концентрации sPD-L1 у больных колоректальным раком повышались по мере распространения первичной опухоли (критерий T). Сходная, но статистически не значимая тенденция отмечена и для критериев N и M, достигавшая уровня статистической значимости при обобщении результатов. Корреляционная зависимость между маркерами sPD-1 и sPD-L1 заметно ослабевала при критериях T4 и N2 (системы TNM), а также была незначимой при критерии M1. Для концентраций маркера sPD-1 подобных связей выявлено не было. При этом отмечена статистически значимая прямая корреляционная связь между уровнями sPD-1 и sPD-L1 в крови здоровых доноров и больных колоректальным раком. Вместе с полученными данными по влиянию показателей на общую выживаемость, представленных **втором разделе 3 главы** на основании полученных в работе данных sPD-1 и sPD-L1 можно рассматривать как перспективный фактор неблагоприятного прогноза у больных раком толстой кишки.

Третий раздел 3 главы посвящен иммуногистохимическому исследованию экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и микроокружении (строме) опухоли у 85 больных аденокарциномой толстой кишки. В опухолевых клетках PD-L1 экспрессируется в 26% случаев и в 64,7% выявлена экспрессия PD-L1 в микроокружении (в стромальных клетках) опухоли. Диссертант показал, что только уровни PD-L1+ клеток в строме опухоли ассоциировали со стадией колоректального рака. Не выявлено корреляционных зависимостей между концентрациями sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови и уровнями экспрессии PD-L1 в опухоли больных колоректальным раком. Полученные данные указывают на необходимость

дополнительных исследований с целью определения их клинической роли у данной категории пациентов.

В главе «Обсуждение» представлено обсуждение полученных результатов и известных, в том числе недавно опубликованных, отечественных и зарубежных литературных данных по проблеме. Сравнительный анализ проведен на высоком уровне и подтверждает научную ценность полученных результатов. В завершении главы представлено заключение.

Выводы соответствуют сформулированной цели и поставленным задачам диссертационной работы, обоснованы, подтверждены фактическим материалом и базируются на достаточном количестве проведенных исследований, поэтому их достоверность не вызывает сомнений.

Практические рекомендации вытекают из результатов исследования, четко и логично сформулированы.

Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

В ходе рецензирования диссертационной работы возникли следующие **замечания:**

- В работе значительное количество рисунков представлены в низком разрешении, что не позволяет четко читать представленную на них информацию;
- В работе повсеместно используется термин «корреляционные зависимости». Вместе с тем, под зависимостью обычно понимают связи с коэффициентом корреляции 1 или -1. Таких связей в работе не было;
- Практические рекомендации преждевременны, поскольку выявленные тенденции требуют валидации. Автором показана корреляционная связь между изучаемыми параметрами и категориями TNM. Оценки дополнительного вклада новых факторов в прогнозирование общей выживаемости не проводилось. Ввиду этого рекомендации по клиническому

применению выявленных факторов преждевременны и требуют дополнительной проверки;

- Выявлен ряд незначительных опечаток и стилистических неточностей.

При анализе исследования возник ряд **вопросов**:

- Вы показали более низкое содержание растворимых форм рецепторов PD-1/PD-L1 у больных опухолями кишки по сравнению со здоровыми пациентами. При этом далее в работе утверждается, что уровень маркера растёт по мере увеличения стадии. То есть получается, что пациенты с более распространённой стадией по своему уровню приближаются к здоровым людям, не смотря на большую запущенность онкологического процесса. Почему с увеличением распространённости рака теряется связь между изучаемыми растворимыми факторами? Как Вы объясняете этот феномен и почему, по-вашему, уменьшение различий между пациентами и здоровыми лицами может являться неблагоприятным фактором прогноза?
- Анализировали ли Вы нелинейные корреляционные связи между изучаемыми уровнями растворимых рецепторов и возрастом? Какие биологические процессы может отражать выявленная корреляционная связь?
- Концентрации менялись в зависимости от локализации первичной опухоли. При этом наибольшие концентрации наблюдались при опухолях селезеночного угла – т.е. по границе правой и левой половин, для которых характерны различные биологические особенности и разная чувствительность к лечению. Есть ли данные о связи именно стандартных биологических особенностей и мутационного профиля опухоли с концентрацией растворимых форм рецепторов у больных колоректальным раком?
- Проводилась ли оценка вариабельности измерений изучаемых факторов?

Выявленные замечания не умаляют значимости работы и не влияют на общую высокую оценку проведенного исследования. В представленном исследовании получены полезные данные для клинической лабораторной диагностики и для клинической онкологии: результаты, вносящие свой вклад в обоснование значимости экспрессии PD-L1 в опухоли и концентрации растворимых форм рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в диагностике, прогрессии опухоли и прогнозе колоректального рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа В.В. Масленникова «Клинико-лабораторное значение экспрессии PD-L1 в опухоли, sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора, академика РАН Кушлинского Николая Евгеньевича, содержащей решение научно-практической задачи, имеющей существенное значение для клинической лабораторной диагностики, - внедрение растворимых форм рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в крови, а также экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и окружающей строме в диагностику и прогноз колоректального рака.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, а также по объему и уровню проведенного исследования диссертационная работа Масленникова В.В. полностью соответствует требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает

присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности
3.3.8 - клиническая лабораторная диагностика.

Доктор медицинских наук, старший научный
сотрудник научного отдела онкоиммунологии
Федерального государственного бюджетного
учреждения
«Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии им. Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



Новик Алексей Викторович

Подпись доктора медицинских наук
Новика Алексея Викторовича
«заверяю»

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



Иванцов Александр Олегович

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, Песочный, ул. Ленинградская, 68.
e-mail: anovik@list.ru
телефон: (812) 4399555

30.05.2024