

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Великановой Людмилы Иосифовны 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 в настоящее время занимает ведущее место по показателям заболеваемости и смертности среди онкологических заболеваний в мире. Прежде всего эти опухоли отличаются гетерогенностью, в ряде наблюдений они характеризуются агрессивным клиническим течением, нечувствительностью к лекарственным методам лечения, а следовательно, и неблагоприятным прогнозом. Кроме того, более 30% пациентов поступают в стационары с распространенным опухолевым процессом и наличием метастазов в отдаленных органах и тканях. При этом противоопухолевая терапия колоректального рака более эффективна в начальных стадиях заболевания. Несмотря на то, что этиология и патогенез колоректального рака, как и большинства опухолей, не изучены, поиск малоинвазивных биологических маркеров для своевременной диагностики этого заболевания в настоящее время является крайне актуальным направлением клинико-лабораторных исследований. В настоящее время наиболее перспективным направлением клинических и лабораторных исследований в онкологии, является изучение роли контрольных точек иммунитета и среди них системы PD-1/PD-L1, главная роль которой – регуляция иммунного ответа, а именно T-клеток, что использует опухоль для «ускользания» от иммунного ответа. Наиболее интересным с научной точки зрения и важным для клиники считают изучение растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 – рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1, которые изучают в последнее десятилетие. В мировой литературе таких работ

достаточно много, но при других более иммуногенных опухолях – меланоме, почечно-клеточном раке. При этом результаты этих исследований не однозначны, а порой и противоречивы. В России – это первая работа, в которой автор изучал клинико-лабораторную значимость sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком, а также экспрессию лиганда PD-L1 в первичной опухоли и окружающих опухоль тканях с учетом стадии заболевания, степени дифференцировки опухоли, наличия регионарных и отдаленных метастазов и конечно прогноза заболевания. Особенности этих современных исследований прежде всего связаны с выбором наборов реактивов для ИФА исследования sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови. Кроме того, особо следует подчеркнуть выбор эпитопов антител, стандартизованного метода иммуногистохимического исследования для определения и интерпретации результатов экспрессии PD-L1 в первичной опухоли. Все выше указанное позволило автору сделать убедительные и достоверные ключевые выводы проведенной работы.

Таким образом, актуальность и своевременность выбранной темы исследования, а также научно-практическое значение диссертационной работы, выполненной В.В. Масленниковым, подтверждают представленные результаты.

Новизна исследования и полученных результатов

Новизна диссертационной работы В.В. Масленникова заключается в том, что ее автор впервые в России провел комплексный анализ уровней sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в сыворотке крови первичных больных колоректальным раком с учетом ключевых клинических и морфологических характеристик заболевания, а также сопоставил уровни выше указанных маркеров с показателями экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и ее стромы у больных колоректальным раком и выявил определенные их связи с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания. Диссертант убедительно доказал, что концентрации sPD-1 и sPD-L1 статистически значимо выше у здоровых людей группы контроля, по

сравнению с больными колоректальным раком и показал, что уровни sPD-1 и sPD-L1 не зависят от характера опухоли, будь то доброкачественная или злокачественная опухоль толстой кишки. Следует обратить внимание на заключение диссертанта о том, что уровни sPD-L1 связаны с полом здоровых людей и больных колоректальным раком и значимо снижены у женщин, чем у мужчин, причем независимо от характера опухоли. Автор работы показал положительную корреляционную ассоциацию уровней рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в сыворотке крови с возрастом больных колоректальным раком. Несмотря на то, что диссертант не выявил связи исходных концентраций исследованных маркеров с типом морфологического строения опухоли, степенью ее дифференцировки и локализацией в толстой кишке, автор работы обнаружил достоверное повышение sPD-L1 в сыворотке крови при увеличении критерия T и при наличии метастазов. Кроме того, при колоректальном раке обнаружена прямая корреляционная связь между концентрациями sPD-1 и sPD-L1. У пациентов с доброкачественными опухолями толстой кишки такая зависимость не отмечена.

Особое значение заслуживает иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 в клетках первичной опухоли больных колоректальным раком, который отмечен у 26% клеток опухоли пациентов, при этом уровни лиганда ассоциировали со стадией новообразования. Не обнаружено связи сывороточных концентраций sPD-1, sPD-L1 с уровнями экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и стромы новообразования у больных колоректальным раком. Это подтверждает мнение многих исследователей в том, что необходимо дальнейшее изучение этого феномена, особенно неоднократно в динамике при обследовании больных раком толстой кишки, чтобы определить клиническую роль sPD-1 и sPD-L1 у этой категории пациентов.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для теории и практики

Практическая значимость полученных результатов для клинической лабораторной диагностики заключается прежде всего в том, что на большом

клиническом материале диссертант исследовал лабораторные биохимические сывороточные маркеры sPD-1, sPD-L1 и выявил их связь с прогрессией колоректального рака – агрессивным биологическим потенциалом новообразования согласно международной классификации TNM. При этом показано, что изученные биомаркеры sPD-1 и sPD-L1 не могут быть использованы в качестве факторов оценки характера выявленного новообразования толстой кишки.

Особо необходимо отметить следующий важный практический вывод работы по изучению рецептора sPD-1 и лиганда sPD-L1 у больных колоректальным раком. Автор работы выделил группу пациентов с колоректальным раком высокого риска, в сыворотке крови которых отмечены концентрации лиганда sPD-L1 \Rightarrow 9,6 пг/мл. Преобладающее большинство этих пациентов имели крайне неблагоприятный прогноз общей выживаемости и очевидно нуждаются после хирургического удаления опухоли в адъювантной лекарственной терапии с последующим пристальным наблюдением.

На основании полученных результатов В.В. Масленников делает очень важное заключение, что на основании данных по содержанию растворимых форм рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в сыворотке крови больных колоректальным раком появляется дополнительная возможность оптимизации процесса диагностики и оценки прогноза у больных злокачественными опухолями толстой кишки, что открывает перспективы новых направлений в клинической лабораторной диагностике и, возможно, расширяет вероятность использования иммунотерапии – ингибиторов контрольных точек иммунитета.

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 диссертационной работы внедрены в клиническую практику клинико-диагностической лаборатории 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 диссертационной работы В.В. Масленникова определяются большим объемом проведенных лабораторных исследований – 160 больных опухолями толстой кишки, из них 15 с доброкачественными новообразованиями и 145 пациентов – с аденокарциномой толстой кишки.

Статистический анализ, выполненный с применением специального программного обеспечения, лежит в основе достоверности полученных результатов. Интерпретация и обсуждение результатов исследования проводились на основании изучения 188 источников отечественных и зарубежных ученых. Положения и выводы диссертации непосредственно вытекают из полученных данных.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации – высокое. 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 В.В. Масленникова написана на 123 страницах машинописного текста и включает оглавление, введение, обзор данных

современной литературы, главы «Материалы и методы исследования», главы «Результаты собственных исследований», а также обсуждения полученных данных, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка цитируемой литературы (41 отечественных и 147 зарубежных источников). Работа написана хорошим литературным языком, а ее результаты хорошо иллюстрированы (32 рисунка и 20 таблиц).

Во введении автор убедительно обосновывает значимость диссертационной работы, четко определены цель и задачи исследования, хорошо представлена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В главе «обзор литературы» представлен подробный анализ современных данных о ключевых компонентах контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 у больных не только колоректальным раком, но и другими злокачественными новообразованиями. При этом, представлены данные о биологических факторах, которые влияют на продукцию sPD-1 и sPD-L1 при выявлении и прогрессировании опухолевого процесса, а также и их ассоциации с основными клиническими и морфологическими характеристиками рака толстой кишки.

Во 2-й главе «Материалы и методы исследования» представлен дизайн исследования, дана подробная клиническая характеристика обследованных групп больных и контроля. В данной главе описаны клинические и лабораторные методы исследования, которые были использованы в работе, методы статистической обработки данных диссертации, которые проведены с использованием современных компьютерных программ.

В 3-главе представлен анализ полученных результатов. Следует указать на важный вывод этих исследований, а именно достоверно низкие сывороточные концентрации sPD-1 и sPD-L1 в общей группе обследованных больных опухолями толстой кишки в сравнении с здоровыми людьми группы контроля. При этом, диссертант не выявил различий в уровнях обоих белков (рецептора sPD-1 и лиганда sPD-L1) между больными доброкачественными и

злокачественными новообразованиями толстой кишки, однако каждый из исследованных маркеров в группе доброкачественных и злокачественных опухолей толстой кишки статистически значимо отличался от контрольной группы здоровых доноров. Автор также не выделил пороговых значений для каждого из обоих белков, разделяющих здоровых доноров и больных опухолями толстой кишки с приемлемой точностью, что позволило ему сделать убедительный вывод о том, что sPD-1 и sPD-L1 не обладают диагностической ценностью при новообразованиях толстой кишки и это подтвердил ROC-анализ.

Вместе с тем, диссертант обнаружил, что сывороточные концентрации sPD-L1 у обследованных женщин ниже, чем у мужчин, как в группе контроля, так и в группах больных независимо от характера выявленного новообразования.

Также автор работы показал, что у мужчин различия уровней 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 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 для рецептора не были статистически значимыми.

Следует отметить также убедительный вывод о том, что концентрации sPD-1 и sPD-L1 связаны с возрастом обследованных трех групп, однако слабой прямой корреляционной зависимостью.

Несомненный интерес имеет анализ изученных биологических маркеров с учетом показателей системы TNM. В работе показано, что сывороточные уровни sPD-L1 у больных раком толстой кишки достоверно связаны с критерием T и повышались при увеличении размера первичной опухоли. Однако следует отметить, что у больных колоректальным раком при выявлении метастазов сывороточные уровни sPD-L1 значимо повышались, поэтому лиганд sPD-L1 можно считать неблагоприятным фактором у больных

раком толстой кишки. Концентрации сывороточного маркера sPD-1 не связаны с критериями системы TNM.

Также в своей работе Маслов В.В. не отметил достоверной ассоциации исходных концентраций sPD-1 и sPD-L1 со степенью дифференцировки колоректального рака. При этом в отличие от больных доброкачественными новообразованиями у пациентов с колоректальным раком выявлена достоверная прямая корреляционная связь между уровнями sPD-1 и sPD-L1 в крови здоровых доноров и больных раком толстой кишки. Корреляционная зависимость между маркерами sPD-1 и sPD-L1 заметно ослабевала при критериях T4 и N2 (системы TNM).

Несомненно, большой интерес у клиницистов может вызвать анализ отдаленных результатов лечения у 103 больных колоректальным раком и их связь с уровнями сывороточных маркеров sPD-1 и sPD-L1. Анализ полученных данных у больных колоректальным раком выявил связь между показателями общей выживаемости и пороговым уровнем только концентрации лиганда sPD-L1. Диссертант показал, что при концентрации sPD-L1 в сыворотке крови $\geq 9,6$ пг/мл отмечено достоверное снижение показателей общей выживаемости по сравнению с пациентами, у которых выявлены концентрации sPD-L1 $< 9,6$ пг/мл.

В 3-й главе автор представил иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и микроокружении (строме) опухоли у 85 больных аденокарциномой толстой кишки. Оказалось, что в клетках опухоли PD-L1 экспрессируется в 26% случаев и в 64,7% выявлена экспрессия PD-L1 в микроокружении (в стромальных клетках) опухоли. При этом только уровни PD-L1+ клеток в строме опухоли ассоциировали со стадией колоректального рака.

И наиболее важный вывод этого раздела исследований заключается в том, что не отмечено корреляционных ассоциаций между сывороточными концентрациями sPD-1, sPD-L1 и уровнями экспрессии PD-L1 в опухоли больных колоректальным раком. Следовательно, анализ растворимых форм

sPD-1 и sPD-L1 настоятельно требует дальнейших исследований, так как позволяет изучать эти биологические маркеры в динамике (мониторинге) заболевания, так как эти белки имеют тесную связь с прогрессией рака толстой кишки.

«Обсуждение» результатов диссертации с учетом результатов современных зарубежных публикаций по этой проблеме заключает представленную работу. Сравнительный анализ проведен на высоком уровне и подтверждает научную ценность полученных результатов. В завершении главы представлено заключение.

Выводы соответствуют 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 и вопросы к диссертанту.

Замечание: Диссертант указывает $p=0,1$ при постепенном повышении уровней sPD-L1 при I стадии 7,1 пг/мл до 10,9 пг/мл при IV стадии.

Вопрос: К каким группам сравнения относится одно значение достоверности различий «р» в таблицах 7,12,16 ?

Заданные замечание и вопрос не снижают достоинства настоящего диссертационного исследования и не влияют на положительную оценку работы.

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 оценку прогноза 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.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, заведующий
научно-исследовательской лабораторией хроматографии
федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

«27» мая 2024 г.



Великанова Людмила Иосифовна

Адрес: 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41.

Телефон: +7 (812) 303-50-00

e-mail: www.szgmu.ru

Подпись д.б.н. Великановой Людмилы Иосифовны заверяю
Ученый секретарь ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

д.м.н., профессор



Трофимов Е.А.