

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Байкова Вадима Валентиновича на диссертацию Харченко Евгении Владимировны «Прогностическое значение клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.12 – онкология, 14.03.02 – патологическая анатомия.

Актуальность темы выполненной работы

В диссертационном исследовании Харченко Евгении Владимировны поставлена цель – повышение эффективности диагностики и лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (DLBCL) путем определения клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик заболевания.

Среди неходжкинских лимфом DLBCL является самым распространённым подтипом. Даже в эру иммунотерапии у многих пациентов (в среднем, ок 20-30%, при non-GCB подварианте – до 50%) с DLBCL развивается рецидив, а в ряде случаев заболевание исходно является рефрактерным к терапии. Таким образом, остается справедливой характеристика, данная в ранних редакциях классификации ВОЗ, которая описывала DLBCL как совокупность заболеваний, различных по биологическим свойствам и клиническому поведению. Лечение рефрактерных\рецидивных опухолей представляет собой одну из сложнейших задач клинической онкогематологии, поскольку стандартные схемы оказываются неэффективными, и требуются модифицированные или новые подходы. Таким образом, оценка риска рефрактерности/рецидива/прогрессии DLBCL до начала лечения является весьма актуальной.

Около 20 лет назад появились работы, демонстрирующие существенные клинические и биологические различия в группе DLBCL в зависимости от профиля экспрессии генов (GCB vs ABC). Почти сразу началось изучение прогностической роли этих генетических подтипов. Однако для внедрения генетической классификации в рутинную практику существуют объективные препятствия, поэтому были предложены иммуногистохимические суррогаты, наиболее широко распространенным из которых является алгоритм Christine Hans (2004). Он демонстрирует совпадение подтипа, определенного на основе иммуногистохимического и генетического исследования, в 79-86% с показателями чувствительности – 82% и специфичности – 90%. С этого времени

накапливаются данные о прогностической и предиктивной роли субклассификации DLBCL на основе алгоритма Hans, однако различные группы исследователей продолжают получать различные данные. В части работ была продемонстрирована достоверная разница в выживаемости в зависимости от молекулярного подтипа, в части работ таких различий не находили (Scott, 2015; Steiger, 2017; Chiappella, 2019). Несовпадение результатов объясняется, по-видимому, гетерогенностью пациентов в отношении принадлежности к прогностическим группам (IPI), различиями терапии и тп. Поэтому накопление данных о возможности прогнозирования течения DLBCL в зависимости от молекулярного подтипа является по-прежнему важным.

В новой редакции классификации лимфоидных опухолей (ВОЗ, 2017) на основе молекулярно-генетических и иммуногистохимических характеристик выделено несколько новых типов DLBCL и пограничных опухолей. Одной из них является лимфома высокой степени злокачественности с транслокациями в генах *c-myc*, *bcl-2* и/или *bcl-6*. Большую часть этих лимфом ранее, по-видимому, диагностировали как DLBCL или В-клеточную лимфому неклассифицированную, с чертами DLBCL и лимфомы Беркитта. Эта лимфома встречается редко. Определение перестроек в генах *c-myc*, *bcl-2* и *bcl-6* осуществляется методом FISH, однако, с учетом редкости таких перестроек и высокой стоимости исследований, рутинное выполнение теста обычно не проводится. DLBCL с коэкспрессией *c-myc*/*bcl-2* без транслокации генов не выделена в качестве самостоятельной формы DLBCL, однако в классификации подчеркивается необходимость определения указанного молекулярного профиля.

DLBCL с двойной экспрессией *c-myc*/*bcl-2* (Green, 2012) и, особенно, с двойной транслокацией *c-myc*/*bcl-2* (Macpherson, 1999) имеют неблагоприятный прогноз. После аутологичной трансплантации ГСК различия в прогнозе сохраняются, а после аллогенной, по некоторым сведениям – отсутствуют (Herrera, 2016). Интересно, что сам по себе факт двойной транслокации не определяет поведение трансформированной В-клетки; так, фолликулярная лимфома с двойной транслокацией *bcl-2*/*c-myc* не имеет отличий от фолликулярных лимфом обычного типа (с изолированной транслокацией *bcl-2* – t(14;18)). Продолжается изучение прогностической роли ряда иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров: CD5, p53, CD30, коэкспрессии белков *c-myc* и *bcl-2*, моноперестройки в генах *c-myc*, *bcl-2* или *bcl-6*, однако и этот анализ далек от завершения. В частности, экспрессия CD10 обычно рассматривается как фактор хорошего прогноза. Однако при первичных костных DLBCL экспрессия CD10, вероятно, не влияет на прогноз.

Таким образом, накопленные к настоящему времени данные не позволяют считать вопрос о прогнозировании течения DLBCL окончательно решенным, и исследования в этом направлении являются своевременными и полезными.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Диссертация является завершенным научным исследованием, которое было выполнено в научном отделе инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации (на базе отделения гематологии и химиотерапии с палатой реанимации и интенсивной терапии) и в научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Диссертационное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.01.12 онкология, 14.03.02 – патологическая анатомия (медицинские науки), пунктам 2 и 6.

Достоверность полученных результатов и выводов не вызывает сомнения. В диссертационном исследовании представлен репрезентативный материал 215 пациентов с DLBCL. Длительный период наблюдения и тщательный анализ данных, проведенный с использованием современных методов статистической обработки, позволяет судить о высокой достоверности полученных результатов. Объем материала является достаточным для решения поставленных целей и задач, обеспечивает достоверность результатов и выводов проведенной работы. Полученные данные в целом сопоставимы с результатами международных исследований и согласуются с отечественными и зарубежными публикациями по данной проблеме.

Все этапы диссертационной работы выполнялись автором или при его непосредственном участии. Автором самостоятельно проведен аналитический обзор отечественных и зарубежных данных по изучаемой проблеме, сформулированы цель и задачи исследования. Выполнен сбор данных на основе первичной документации, сбор биологического материала, разработана и заполнена электронная база данных. Подготовка серийных срезов с парафиновых блоков, окрашивание и оценка уровней экспрессии молекулярных маркеров, статистическая обработка результатов проводилась с личным участием автора. Диссертантом осуществлен анализ и интерпретация полученных данных, сформулированы выводы, оформлена диссертационная работа.

Для статистической обработки полученных результатов использовались методы как непараметрической, так и параметрической статистики. Обработка данных осуществлялась при помощи современных статистических программ. Первичные данные вносились в базу данных Microsoft Office Access. Статистический анализ проводился на персональном компьютере с использованием программы IBMS PSS Statistics версии 17.0 с расширенным модулем для анализа выживаемости. Непараметрические данные анализировались с использованием теста X^2 или точного критерия Фишера. Показатели выживаемости рассчитывались методом Kaplan-Meier, различия оценивались Log-Rank тестом. Для выявления прогностической значимости факторов использовался однофакторный и многофакторный регрессионный анализ Cox, со стандартной ошибкой и 95% доверительным интервалом. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Апробация диссертации состоялась на собрании научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с кафедрами онкологии ФГБОУ ВО СЗГМУ «Северо-Западного государственного медицинского университета имени академика И.И. Мечникова» Минздрава России. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на II онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2016); на конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва 2017); на постерной сессии ежегодного конгресса European Society of Medical Oncologists (Мюнхен, Германия 2018); на постерной сессии ежегодного конгресса European Blood and Marrow Transplantation Society (Лиссабон, Португалия 2018).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, включая 5 работ в журналах, рецензируемых ВАК. Получена приоритетная справка на изобретение по заявке на патент РФ «Способ дифференциальной диагностики диффузных В-клеточный крупноклеточных лимфом» № 2020108031 от 21.02.2020.

Научная новизна диссертационного исследования

В ходе лабораторных и клинических исследований был получен ряд данных о прогностической значимости клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров DLBCL. Эти данные содержат элементы принципиальной новизны и безусловно представляют научный интерес.

На материале пациентов, получавших стандартные схемы иммунохимиотерапии с ранней интенсификацией, определена частота и прогностическая значимость ряда

иммуногистохимических маркеров (*c-myc*, *bcl-2*, *bcl-6*, p53, CD30, CD5, а также входящих в алгоритм Hans CD10, *bcl-6*, MuM.1) и молекулярно-генетических маркеров (транслокаций в генах *c-myc*, *bcl-2*, *bcl-6*). Часть изученных показателей у таких пациентов ранее была ограничено исследована или не исследована вовсе. Впервые оптимизирован алгоритм для диагностики лимфом высокой степени злокачественности с перестройками в генах *c-myc*, *bcl-2*, *bcl-6*, при отсутствии возможности рутинного использования FISH.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты работы могут быть использованы для улучшения диагностики пациентов с DLBCL. Новые данные о молекулярно-биологических факторах прогноза, полученные автором, в сопоставлении с уже изученными маркерами помогают лучше понять природу и механизмы течения DLBCL. Результаты исследования могут быть использованы для оптимизации терапии DLBCL, планирования новых фундаментальных исследований, оптимизации лечения более агрессивных форм заболевания.

Общая характеристика работы

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Работа изложена на 129 страницах, написана на современном научно-методическом уровне. Включает введение, обзор литературы, 3 главы собственных исследований (материалы и методы исследования, собственные данные, обсуждение), выводы, практические рекомендации и список литературы. Диссертация содержит таблицы и рисунки, в том числе микрофотографии препаратов высокого качества, что значительно облегчает восприятие материала. Список литературы включает 129 источников, из которых 10 принадлежат перу отечественных авторов.

Во введении отражена актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи работы, описаны научная новизна, практическая значимость, выдвигаются положения, выносимые на защиту.

В главе 1 (обзор литературы) отражено современное состояние диагностики и лечения DLBCL. Представлены данные о новых нозологических подтипах DLBCL (в соответствии с новой редакцией классификации ВОЗ). Подробно описаны имеющиеся сведения о влиянии различных клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров на прогноз при DLBCL. Обзор написан хорошим литературным

языком, легко читается и демонстрирует глубокое понимание автором исследуемого вопроса. Можно лишь заметить, что продолжительность жизни долгоживущих плазматических клеток, конечно, не ограничена 1 месяцем (стр.16), однако эта неточность, скорее – на совести автора цитируемой монографии (издана в 2018 г.), который, в свою очередь, ссылается на данные, опубликованные до 1997 г., когда стало возможным получить точные сведения по этому вопросу.

В главе 2 представлена детальная характеристика 215 пациентов с DLBCL, включенных в исследование. Детально описаны методы диагностики, стадирования заболевания, протоколы лечения. Даны подробные сведения о протоколах гистологической обработки материала и методике иммуногистохимического исследования. Приведено описание методов статистического анализа. Глава отражает в целом высокий методологический и технический уровень выполненной работы. Можно отметить, что методика оценки результатов иммуногистохимического исследования описана довольно коротко. Пороговые значения указаны для оценки уровня экспрессии *c-myc*, *bcl-2*, *p53*, *bcl-6* и *CD10*, в другой главе – *MuM.1*, однако, к сожалению, отсутствуют сведения о методике оценки экспрессии других изученных маркеров.

В главе 3 автор излагает результаты собственного исследования. Определена частота ряда клинических характеристик пациентов с DLBCL (как В-симптомы, III-IV стадия заболевания, первично-рефрактерное течение, наличие экстранодальных поражений). В соответствии с рекомендациями классификации ВОЗ (пересмотр 2017 г.) на основе алгоритма Hans определена принадлежность DLBCL к иммуногистохимическим подтипам GCB и non-GCB, методом FISH с зондами «break-apart» обнаружены транслокации в генах *c-myc*, *bcl-6*, *bcl-2*. Определена частота ряда иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров. Некоторые клинические проявления заболевания оказались ассоциированы с более низкими показателями ВВП; это наличие В-симптомов, III-IV стадии заболевания, первично-рефрактерное течение. Пациенты с экспрессией *CD10* (GCB-подтип) имели меньший риск развития рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии *CD10*. В проведенном исследовании двойные транслокации обнаружены не были, тогда как суммарная частота одиночных транслокаций изученных генов составила 20,8%. Таким образом была подтверждена низкая частота лимфом с наличием одновременных перестроек в генах *c-myc*, *bcl-2* и/или *bcl-6* в общей популяции больных с DLBCL.

В главе 4 проведено обобщение полученных результатов. Обсуждается влияние на прогноз заболевания различных клинических, ИГХ и молекулярно-генетических особенностей пациентов с DLBCL в сопоставлении с литературными данными. Автор

детально объясняет, что, ожидаемые различия в выживаемости пациентов с двойной экспрессией *c-myc* и *bcl-2* были нивелированы ранней интенсификацией лечения. Приведен разработанный автором оптимизированный алгоритм для диагностики лимфом высокой степени злокачественности с перестройками в генах *c-myc*, *bcl-2*, *bcl-6* при отсутствии возможности рутинного использования FISH: подробно описаны этапы выполнения анализа, представлена графическая схема. Во всей работе обозначения и генов, и соответствующих им белков даны прямым шрифтом. В соответствии с современными требованиями для обозначения генов принято использовать курсив.

Выводы диссертации соответствуют задачам исследования, объективны, корректны и целиком вытекают из ее содержания. Материалы диссертации полностью отражены в автореферате и в 7 опубликованных работах. Основные результаты неоднократно докладывались на российских и международных научных конференциях. Принципиальных замечаний по существу и оформлению работы нет, можно лишь отметить, что названия генов принято в тексте давать курсивом, а белков – прямым шрифтом (курсив отсутствует). Описанные недочеты не снижают общей положительной оценки работы. В порядке дискуссии хотелось бы получить ответы на несколько вопросов.

1. Очень интересным фактом является обнаружение экспрессии CD5 на опухолевых клетках в 34% наблюдений (обычно среди DLBCL описывается не более 5-10% CD5+ лимфом). На рис. 33 окрашена одна клетка с фигурой митоза, которая может принадлежать опухолевому клону, остальные, очевидно, являются Т-лимфоцитами. В связи с этим возникает вопрос: как учитывалась экспрессия CD5? Каков был порог? Проводилось ли морфометрическое исследование с подсчетом доли (количества) CD5+ клеток?

2. В вашей работе было продемонстрировано выравнивание рисков у пациентов с DLBCL-DE+ и DLBCL-DE- при интенсификации терапии. В то же время есть данные, что использование интенсивных протоколов (BFM-90+R) в качестве стартовой терапии не позволяет преодолеть эти различия (Мисюрина, 2015). Каков, на Ваш взгляд, механизм достижения преимущества при ранней интенсификации по сравнению с использованием интенсивных протоколов в качестве стартовой терапии?

Заключение

Диссертационное исследование Харченко Евгении Владимировны «Прогностическое значение клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик диффузной В клеточной крупноклеточной лимфомы»,

