

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

заведующего лабораторией абдоминальной онкопатологии РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова доктора медицинских наук, доцента Шмака Андрея Ивановича на диссертационную работу Орехвы Андрея Владимировича «Клиническое значение *BIRC5*-положительных циркулирующих опухолевых клеток при колоректальном раке», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 - онкология

**Соответствие диссертации специальности и отрасли науки, по которым она представлена к защите**

Диссертационная работа Орехвы А.В. «Клиническое значение *BIRC5*-положительных циркулирующих опухолевых клеток при колоректальном раке» по своему содержанию, совокупности опубликованных работ и представленных докладов на научных съездах и конференциях соответствует специальности 14.01.12 - онкология (медицинские науки), отвечает требованиям п. 20, 21 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий (Указ Президента Республики Беларусь от 17.11.2004 г. № 560).

### **Актуальность темы диссертации**

В течение последних десятилетий в большинстве как развитых, так и развивающихся стран мира отмечается неуклонный рост заболеваемости колоректального рака (КРР). Это одна из самых частых онкологических патологий и занимает третье место среди злокачественных новообразований населения земного шара.

По данным белорусского канцер-регистра в 2020 году зафиксировано 5516 новых случаев КРР, что составляет 13,2% от числа всех случаев злокачественных новообразований как мужского, так и женского населения. Колоректальный рак остается одним из самых распространенных видов злокачественных новообразований, но его можно и предотвратить. Скрининг и молекулярная диагностика генетической предрасположенности позволяют точно определять группы риска, что в последующем улучшает результаты лечения и, как следствие, общую выживаемость пациентов.

После радикально проведенного лечения примерно у 50% пациентов, страдающих КРР, развиваются отдаленные метастазы, причем у 80–90% этих пациентов они изначально неоперабельны ввиду размера и локализации.

Общая 5-летняя выживаемость при КРР составляет около 50%. Прогноз заболевания в основном зависит от стадии, морфологических особенностей опухолевого процесса, степени дифференцировки опухоли, лимфоваскулярной инвазии и радикальности проведенного лечения.

Существует и ряд поведенческих особенностей биологии опухолевого процесса, в том числе и агрессивный фенотип, который обусловлен статусом мутации генов, экспрессией генов опухолевой прогрессии и изменением сигнальных путей. Исследование опухолевого фенотипа и поиск дополнительных маркеров опухолевой прогрессии помогут в диагностике минимальной остаточной болезни (МОБ) при раке толстой кишки.

Из онкогематологии в лечение солидных опухолей недавно пришло понятие «минимальная остаточная болезнь». Термин «минимальная остаточная болезнь», или сокращенно МОБ (MRD - minimal residual disease от англ.) определяется как присутствие опухолевых клеток в организме, которые не могут быть обнаружены на основе использования рутинных диагностических методов. Также в настоящее время широко используется термин «минимальный остаточный (резидуальный) рак», который подразумевает наличие у радикально пролеченных пациентов циркулирующих или диссеминированных опухолевых клеток.

Согласно литературным данным, даже современные технологии, обладающие высокой разрешающей способностью такие как МРТ, ПЭТ/КТ не позволяют уловить раннее распространение опухолевых клеток из первичной опухоли, что препятствует началу своевременного и потенциально эффективного лечения.

Несмотря на многочисленность и обширность знаний относительно метастатического каскада, детальные и частные механизмы последнего полностью не изучены.

В настоящее время особое внимание уделяется исследованиям, направленным на изучение злокачественных клеток, способных выжить из первичной опухоли и выживать в периферической крови, таких как циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК). Важной составляющей настоящих исследований является изучение механизмов, с помощью которых реализуются эти процессы. Сегодня понятно уже, что ЦОК являются непосредственным субстратом отдаленных метастазов и определяют эту раннюю диссеминацию.

Учитывая тот факт, что ЦОК могут сохраняться после радикальной хирургической операции, актуальным является вопрос о дополнительной адьювантной системной противоопухолевой терапии, направленной на эрадикацию этих клеток. Согласно экспериментальным данным

химиотерапия не всегда достаточно эффективны в отношении уничтожения ЦОК, что обусловлено определенными биологическими характеристиками этих клеток.

Обнаружение ЦОК и определение их агрессивного фенотипа и есть решение проблемы в диагностике МОБ при колоректальном раке. Наибольший потенциал «жидкостной биопсии» на основе ЦОК заключается в прямом молекулярном анализе, что позволяет исследовать ЦОК на наличие клинически значимых мутаций, опухолевой экспрессии или даже изучить целые геномы на уровне отдельных клеток. Одним из перспективных маркеров для изучения агрессивного опухолевого фенотипа является антиапоптотический ген сурвивин (*BIRC5*).

Вышеизложенное явилось побудительным мотивом исследования и определяет актуальность диссертационной работы Орехвы А.В., направленной на изучение клинической значимости *BIRC5*-положительных циркулирующих опухолевых клеток у пациентов, страдающих колоректальным раком.

#### **Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту**

Новизна четырех положений, выносимых на защиту в диссертации Орехвы А.В. имеется и представлена следующим.

Установлено, что *BIRC5*-положительные опухоли при колоректальном раке встречаются у большинства пациентов (85,3%) и их наличие зависит от глубины опухолевой инвазии ( $p=0,013$ ) и размера первичной опухоли ( $p=0,04$ ). Так же на наличие *BIRC5*-положительных аденом влияет размер опухоли ( $p=0,035$ ) и гистологический подтип ( $p=0,004$ ). Выявлены статистически значимые различия в уровне экспрессии мРНК *BIRC5* при аденомах и колоректальном раке ( $p<0,0001$ ).

Также впервые определено, что *BIRC5*-положительные ЦОК при КРР встречаются у большинства пациентов (76,2%) и их наличие зависит от стадии ( $p=0,019$ ), поражения регионарных л/у ( $p=0,03$ ). Уровень экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК при раке толстой кишки выше по сравнению с аденомами ( $p<0,0001$ ). При колоректальном раке ЦОК обнаруживаются в периферической крови на всех этапах лечения -до и после хирургического вмешательства, во время проведения адьювантного лечения.

Впервые установлено, что наличие *BIRC5*-положительных ЦОК через 9 месяцев после хирургического лечения является неблагоприятным прогностическим признаком. Скорректированная 5-летняя выживаемость и

составляет 100% и 96,5%, а с наличием ЦОК – 66,3% и 57,5% соответственно ( $p=0,0006$  и  $p=0,0003$ ).

Доказана прогностическая и предиктивная значимость уровня экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК через 9 месяцев после хирургического лечения при КРР. Скорректированная 5-летняя выживаемость и 5-летняя безрецидивная выживаемость пациентов с уровнем экспрессии  $<2$  отн. ед. составляет 87,3% и 78,2%, в то время как аналогичная выживаемость пациентов с экспрессией  $> 2$  отн. ед. – 20,0% и 12,0% соответственно ( $p < 0,0001$  и  $p < 0,0001$ ).

Доказано, что независимыми прогностическими факторами возврата заболевания у пациентов, страдающих колоректальным раком, являются отдаленные метастазы ОР=6,5 ( $p=0,001$ ), пораженные регионарные л/у ОР=2,6 ( $p=0,005$ ) и уровень мРНК сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК  $\geq 2$  отн. ед. через 9 месяцев после хирургического лечения ОР=5,7 ( $p < 0,001$ ).

Разработанный новый метод определения МОБ у пациентов, страдающих колоректальным раком, на основе оценки экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК через 9 месяцев после хирургического лечения является статистически значимым ( $AUC=0,875$ ,  $p < 0,0001$ ), что позволяет использовать его в специализированных онкологических стационарах.

### **Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Дизайн исследования, объем выборки, использование лабораторных тестов, адекватная статистическая обработка полученных данных не позволяет подвергнуть сомнению достоверность полученных в диссертационной работе результатов, обоснованность вынесенных на защиту четырех научных положений, представленных выводов и практических рекомендаций.

Исследование базируется на анализе данных, полученных в ходе исследования биологического материала и клинических данных 130 пациентов с опухолями толстой кишки (109 пациентов группы исследования, страдающих колоректальным раком и 21 – группы наблюдения с аденомами толстой кишки).

Проведено проспективное сплошное нерандомизированное исследование с целью изучения экспрессии мРНК сурвивина *BIRC5* в опухолевом материале и ЦОК у пациентов исследуемых групп до хирургического лечения и в динамике через 3–6–9 месяцев после лечения, а также клинического и прогностического значения *BIRC5*-положительных

также клинического и прогностического значения *BIRC5*-положительных ЦОК у пациентов, страдающих раком толстой кишки, позволившее получить объективные и достоверные данные.

Полученные результаты обоснованы применением необходимых современных статистических методов обработки, включающих как описательную статистику (параметрическую, так и непараметрическую), так и сложные методы обработки данных как ROC-анализ, а также многофакторный анализ по Коксу.

Сформулированные выводы, положения диссертации и рекомендации, сделанные на основании полученных данных, вполне обоснованы, аргументированы, являются грамотными, логичными и достоверными.

### **Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию**

Работа выполнена в рамках темы БРФФИ «Определение роли секретора, транскриптома и микровезикул тромбоцитов в пролиферации и метастазировании солидных злокачественных опухолей и разработка новых неинвазивных подходов к их диагностике и мониторингу эффективности противоопухолевой терапии» (2022–2025 гг.), номер госрегистрации 20230159 от 31 января 2023 г. и реализована на базе УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Диссертационное исследование соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 гг., утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 г. № 166 (пункт 4. Медицина, фармацевтика, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний), а также приоритетным направлениям научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 г. № 156 (пункт 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи).

Научная значимость диссертационной работы заключается в получении нового знания об опухолевом процессе, заключающегося в установлении роли циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих ген *BIRC5*. Также научная значимость диссертационной работы определяется

разработкой и клиническим обоснованием принципиально нового подхода в диагностике минимальной остаточной болезни на основе изучения циркулирующих опухолевых клеток, их транскрипционного фенотипа, на всех этапах специального лечения колоректального рака.

С клинической точки зрения, принципиально важным является впервые доказанное прогностическое и предиктивное значение циркулирующих опухолевых клеток при колоректальном раке. Автором доказано, что уровень экспрессии мРНК сурвивина в циркулирующих опухолевых клетках является прогностически неблагоприятным признаком. Данный факт позволяет применять определение экспрессии гена *BIRC5* в ЦОК как критерий минимальной остаточной болезни.

Практическая значимость работы заключается в использовании полученных результатов диссертационного исследования в деятельности учреждений здравоохранения с целью выявления МОБ у радикально пролеченных пациентов, страдающих КРР. Практическая значимость работы подтверждена 1 утвержденной в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь инструкцией по применению и 6 актами внедрения.

Социальная значимость работы состоит в ранней диагностике прогрессирования опухолевого процесса у радикально пролеченных пациентов, что позволит своевременно начать лекарственную терапию и, как следствие, приведет к увеличению выживаемости и повышению качества жизни пациентов, страдающих раком толстой кишки.

### **Опубликованность результатов диссертации в научной печати**

Полученные в диссертации результаты опубликованы в 14 научных работах. Из них 6 статей в научных журналах, входящих в перечень ВАК Республики Беларусь общим объемом 5,5 авторских листа.

В сборниках научно-практических конференций опубликовано 7 статей. Утверждена и издана 1 инструкция по применению.

Результаты работы широко обсуждены на международных и республиканских научных форумах.

Таким образом, выносимые на защиту положения и выводы диссертации достаточно апробированы и подтверждены публикациями.

### **Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК**

Оформление диссертационной работы Орехвы Андрея Владимировича «Клиническое значение *BIRC5*-положительных циркулирующих опухолевых

клеток при колоректальном раке» полностью соответствует требованиям ВАК Республики Беларусь. Диссертация написана в традиционном стиле. Разделами научного труда являются: введение; общая характеристика работы; три главы, включающие аналитический обзор литературы, описание материала, методов и полученных результатов исследования; заключение; выводы; библиографический список, включающий 113 источника литературы преимущественно англоязычных, список публикаций соискателя и приложений. Диссертация изложена на русском языке, обильно иллюстрирована таблицами и рисунками (48 и 34 соответственно). Полный объем диссертации составляет 122 страницы.

Во введении автор определяет круг вопросов, касающихся выявления минимальной остаточной болезни при колоректальном раке, решение которых представляет в целом актуальную проблему для практического здравоохранения.

В аналитическом обзоре литературы приведены последние, преимущественно, зарубежные научные данные о значении циркулирующих опухолевых клетках при раке толстой кишки. Изложены вопросы и проблемы связанные со сложностью обогащения, выделения и изоляции ЦОК. Также автор приводит информацию о методах диагностики такого состояния как МОБ. Детально описана молекулярно-биологическая характеристика антиапоптотического гена *BIRC5* и особенности его экспрессии в ЦОК и опухолевой ткани при колоректальном раке. Проведенный автором метаанализ опубликованной литературы, является несомненным украшением данной главы.

Во второй главе «Материалы и методы» изложены сведения о дизайне исследования, контингенте пациентов, клинические критерии включения и исключения пациентов в исследование, характеристике опухолевого процесса. Подробно описаны применяемые методы исследования ЦОК, используемые диагностические наборы и тест-системы, а также способы оценки экспрессии гена *BIRC5*. Расписаны варианты лечения пациентов исследуемых подгрупп. Детально описаны методы и способы статистической обработки полученных данных.

Третья глава посвящена детальному исследованию экспрессии гена *BIRC5* в опухолевой ткани и циркулирующих опухолевых клетках на всем периоде наблюдения и лечения пациентов исследуемых групп, с учетом клинко-биологической характеристикой пациентов. Также в третьей главе представлены результаты оценки выживаемости пациентов и прогрессирования заболевания с учетом наличия ЦОК до- и после лечения и их транскрипционного фенотипа. Благодаря проведенному многофакторному

анализу по Коксу, удалось определить новые независимые прогностические факторы риска возврата болезни, такие как наличие в периферической крови ЦОК, экспрессирующих ген *BIRC5* через 9 месяцев после хирургического лечения. Было определено, что гиперэкспрессия мРНК *BIRC5* в циркулирующих опухолевых клетках статистически значимо отражает МОБ у ранее радикально пролеченных пациентов.

В каждой главе обобщаются полученные данные с формулировкой выводов. Заключение диссертационной работы состоит из семи обоснованных выводов. Приложения подтверждают практическую значимость работы и представлены копией инструкции по применению и актами внедрения в лечебную деятельность учреждений здравоохранения республики и учебный процесс медицинского вуза.

Автореферат диссертации соответствует содержанию работы.

Работа написана грамотным научным языком. Принципиальных замечаний и вопросов по работе нет.

#### **Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует**

Анализ материалов, представленных А.В. Орехвой, их объем и качество, свидетельствует о том, что в своей отрасли и области знаний диссертант является специалистом высокой квалификации, умеет творчески переосмыслить литературные данные, провести анализ полученных результатов и способен вести грамотно и самостоятельно научную работу. Это позволило диссертанту обосновать тему научного исследования, сформулировать задачи и положения, выносимые на защиту, выполнить обработку полученных данных, сформулировать выводы и практические рекомендации. Содержание опубликованных работ не оставляет сомнений о широком кругозоре и личном вкладе соискателя в науку. Стиль изложения свидетельствует о грамотности и научной зрелости автора.

Таким образом, научная квалификация Орехвы А.В. соответствует степени кандидата медицинских наук, на которую он претендует, что подтверждается достаточным количеством научных публикаций по теме диссертации и докладов на научных форумах, внедрением в практическое здравоохранение, использованием современных методов исследования и анализа материала, высоким качеством проведенной работы.

## Заключение

Диссертационная работа А.В. Орехвы «Клиническое значение *BIRC5*-положительных циркулирующих опухолевых клеток при колоректальном раке», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 - онкология, является завершенным, самостоятельно выполненным научным исследованием, содержащим принципиально новые достоверные результаты, свидетельствующие о существенном вкладе их в решении научной проблемы, а именно: определение клинического значения *BIRC5*-положительных циркулирующих опухолевых клеток у пациентов, страдающих колоректальным раком.

Диссертационная работа соответствует пунктам 20 и 21 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», а ее автор, Орехва Андрей Владимирович заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 - онкология за:

-установление факта наличия *BIRC5*-положительных опухолей у 85,3% пациентов, страдающих раком толстой кишки, частота выявления которых коррелирует с глубиной опухолевой инвазии ( $p=0,013$ ) и размером опухоли более 50 мм ( $p=0,04$ );

-установление связи между изменением уровня экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в опухолевой ткани и глубиной опухолевой инвазии (Т3–Т4) ( $p=0,007$ ;  $r=0,26$ ), наличием пораженных регионарных л/у ( $p=0,045$ ;  $r=0,19$ ), размером опухоли более 50 мм ( $p=0,014$ ;  $r=0,22$ ) и стадии (III–IV) ( $p=0,001$ ;  $r=0,31$ );

-доказательство различий в уровне экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в аденокарциноме толстой кишки и ЦОК по сравнению с аденомами ( $p<0,0001$  и  $p<0,0001$  соответственно);

-установление факта наличия *BIRC5*-положительных ЦОК в периферической крови у 76,2% пациентов, страдающих раком толстой кишки, частота выявления которых коррелирует со стадией опухолевого процесса (III–IV) ( $p=0,019$ ), состоянием регионарных л/у ( $p=0,03$ ), наличием *BIRC5*-положительных опухолей ( $p=0,044$ );

-доказательство изменений уровня экспрессии мРНК сурвивина (*BIRC5*) в ЦОК в зависимости от состояния регионарных л/у ( $p=0,002$ ;  $r=0,27$ ), наличия отдаленных метастазов ( $p=0,005$ ;  $r=0,26$ ), стадии опухолевого процесса ( $p=0,004$ ;  $r=0,27$ ), степени дифференцировки опухоли (G3) ( $p=0,001$ ;  $r=0,29$ ) и ее гистологического строения ( $p=0,02$ ;  $r=0,21$ );

- доказательство прогностической значимости наличия циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих маркерный ген *BIRC5*, через 9 месяцев после хирургического лечения в определении риска развития генерализации опухолевого процесса (95% ДИ 3,18–13,34;  $p < 0,0001$ );

- разработку и апробацию нового метода определения минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих раком толстой кишки, путем определения экспрессии гена *BIRC5* в циркулирующих опухолевых клетках ( $AUC = 0,875$ ,  $p < 0,0001$ ).

Официальный оппонент:  
заведующий лабораторией  
абдоминальной онкопатологии  
РНПЦ ОМР им Н.Н. Александрова, д.м.н., доцент

А.И. Шмак

11.11.2024 г.

Подпись  
удостоверяю

Инспектор  
отдела кадров



А.А. Малошова