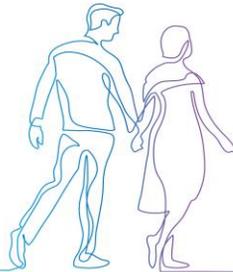
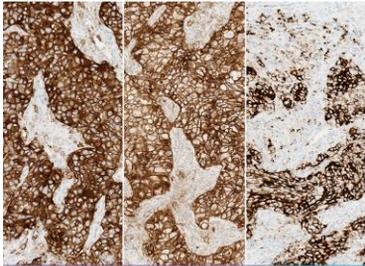
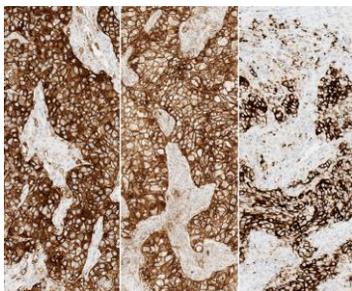


Сопутствующая диагностика к иммунотерапии в онкологии.

Критерии оценки и вопросы качества диагностики.

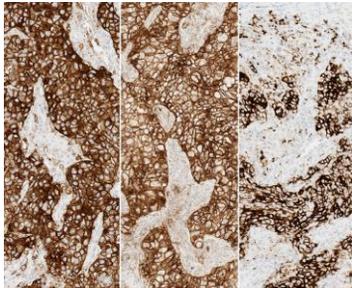


Л.Э. Завалишина



- **Общее**
- **Антитела к PD-L1**
- **Особенности интерпретации**
- **Контроль качества**





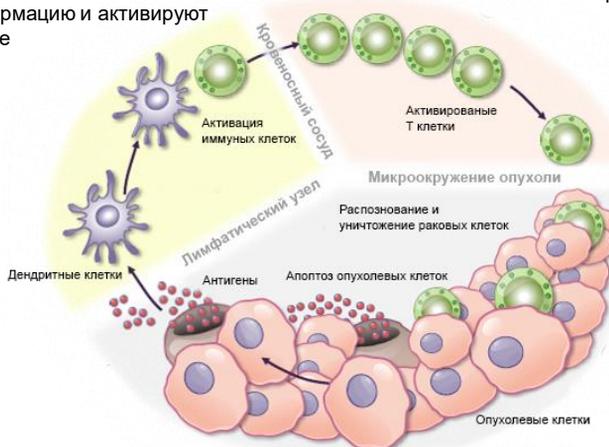
- **Общее**
- Антитела к PD-L1
- Особенности интерпретации
- Контроль качества



Иммунный цикл при онкологических заболеваниях

Дендритные клетки захватывают опухолевые антигены, затем передают информацию и активируют цитотоксические Т-клетки

Активированные Т-клетки проникают в опухолевое микроокружение

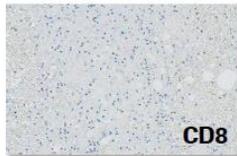


Т-клетки распознают и уничтожают раковые клетки

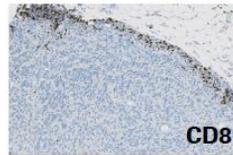
Апоптоз опухолевых клеток приводит к высвобождению из опухоли дополнительных антигенов



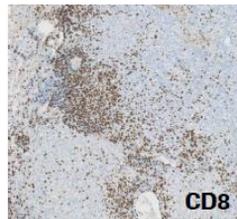
Механизмы защиты опухоли от иммунной системы



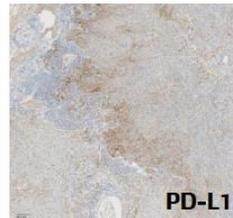
Отсутствие иммунных клеток



Иммунные клетки по периферии опухоли



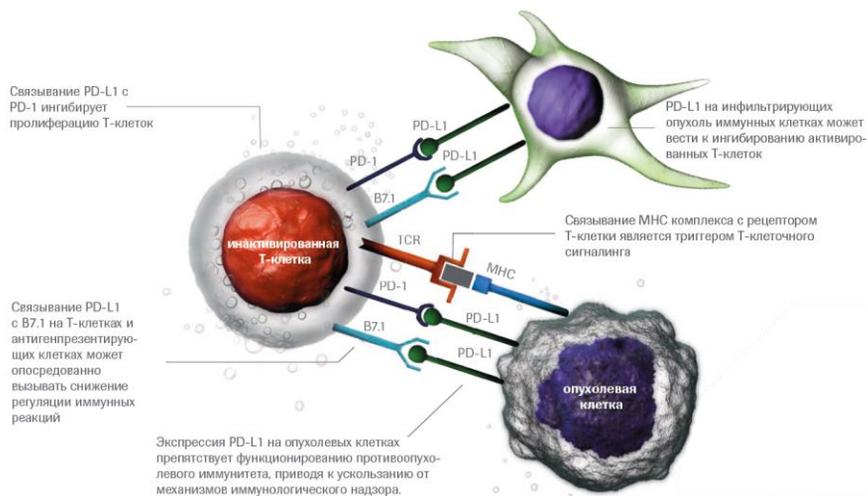
T-клетки присутствуют, но...

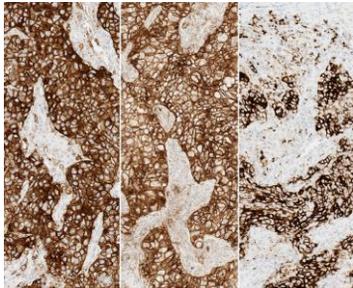


...инaktivированы



Связывание PD-L1 на ОК и ИК с PD-1 приводит к подавлению цитотоксической активности Т-клеток в микроокружении опухоли



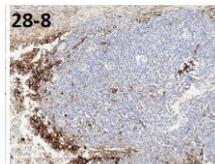
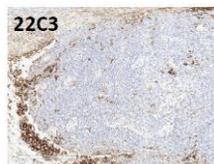
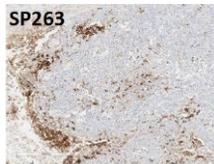


- Общее
- **Антитела к PD-L1**
- Особенности интерпретации
- Контроль качества



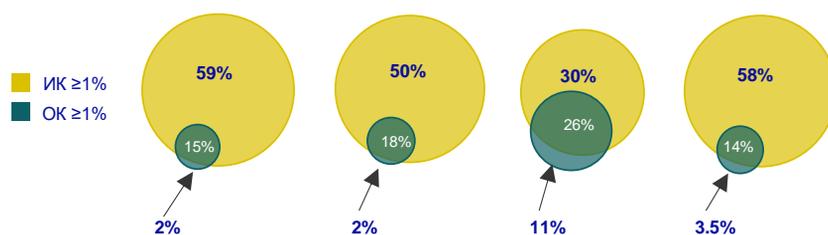
Антитела к PD-L1

	SP263	22C3	28-8	SP142
Производитель	Ventana	Dako	Dako	Ventana
Мишень	Опухолевые клетки	Опухолевые клетки	Опухолевые клетки	Иммунные и опухолевые клетки
Эпитоп	Внеклеточный	Внеклеточный	Внеклеточный	Внутриклеточный
Терапевтические препараты	Дурвалумаб, Пембролизумаб, Ниволумаб	Пембролизумаб	Ниволумаб	Атезолизумаб



Экспрессия PD-L1 на иммунных клетках при разных типах опухолей может преобладать над экспрессией на опухолевых клетках

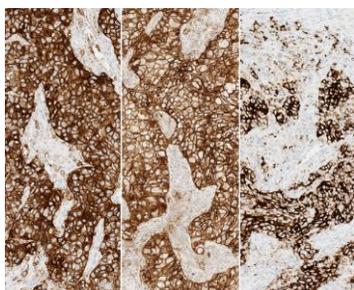
	ПКР ¹	МУК ¹	НМРЛ ²	ТНРМЖ ¹
Исследование	WO29074 (N=253) Фаза II	IMvigor210 (N=311) Фаза II	POPLAR (N=287) Фаза II	PCD4989g (N=413) Фаза I



Распространенность PD-L1 по данным ИГХ по методу ИГХ Roche/Ventana PD-L1 (SP142)
 МУК=метастатическая уротелиальная карцинома; ПКР=почечноклеточный рак
 ТНРМЖ=тройной негативный рак молочной железы

9

Данные продолжающихся клинических исследований
 1. Roche/GNE неопубликованные данные 2. Fehrenbacher, et al. Lancet 2016



- **Общее**
- **Антитела к PD-L1**
- **Особенности интерпретации**
- **Контроль качества**

10

Алгоритм обработки образца



1. Убедиться в адекватности препарата Н&Е минимум 50 жизнеспособных опухолевых клеток
2. Убедиться в качестве окрашивания контрольного стекла (ткань миндалина)
3. Убедиться в качестве иммуногистохимического окрашивания
4. Убедиться в качестве негативного контроля
5. Приступить к интерпретации окрашивания в соответствии с алгоритмом

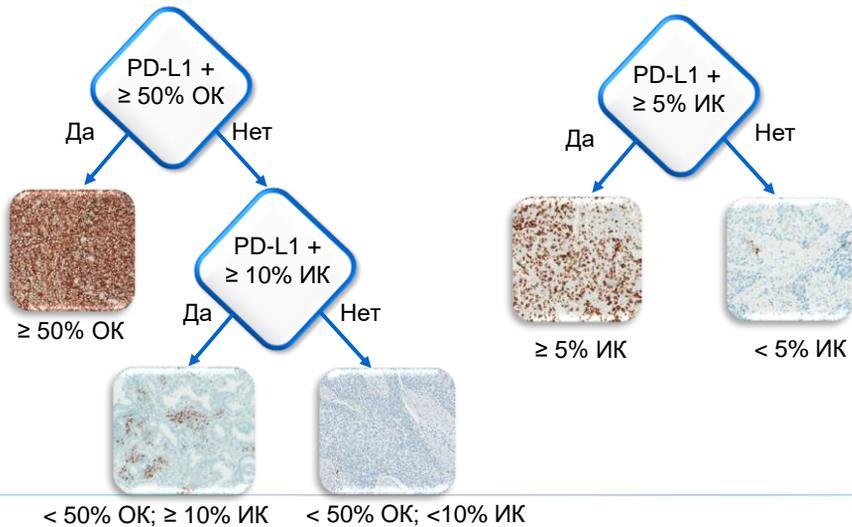


11

Алгоритм оценки окрашивания

Немелкоклеточный Рак Легкого

Уротеральная Карцинома



12

Характеристики окрашивания

Характеристики опухолевых клеток	
Типы клеток	Жизнеспособные опухолевые клетки
Тип окрашивания	Какое-либо заметное окрашивание PD-L1 на мембране любой интенсивности
Знаменатель при подсчете	Площадь области опухоли

Характеристики опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток	
Типы клеток, демонстрирующие окрашивание	Лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты
Типы клеток, включенные в оценку	Лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты
Картина	Агрегаты в строме, единичные клетки, рассеянные среди опухолевых клеток с точечным, линейным или циркулярным окрашиванием
Знаменатель при подсчете	Площадь области опухоли

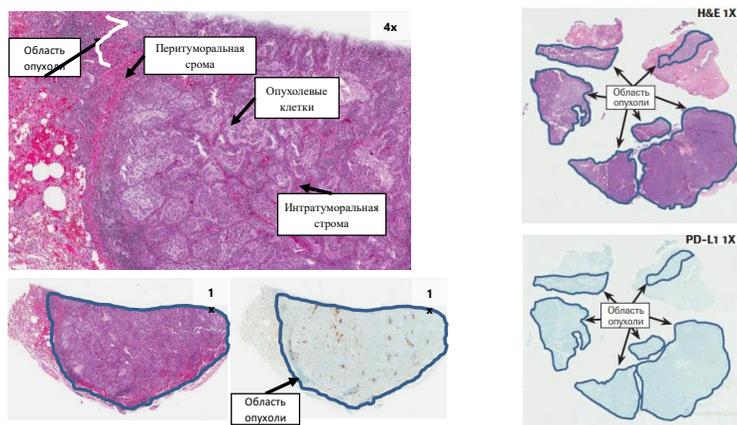


13

13

Шаг 1: Определить область опухоли

Область опухоли - область, занятая опухолевыми клетками, а также интратуморальной и смежной перитуморальной стромой

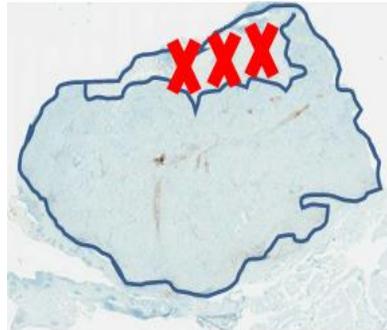


14

14



Шаг 2: Исключение области некроза из области опухоли



15

15

Шаг 3. Подсчет PD-L1 окрашенных клеток

Tumor proportion score

$$\text{TPS} = \frac{\# \text{PD-L1 окрашенных ОК}}{\text{Общее \# жизнеспособных ОК}}$$

$$\text{TC} = \frac{\text{ОК PD-L1+}}{\text{Общая площадь опухоли}}$$

Mononuclear immune cell density

$$\text{MIDS} = \frac{\# \text{PD-L1 окрашенных ИК}}{\text{Общее \# жизнеспособных ОК}} \times 100$$

$$\text{IC} = \frac{\text{Область ИК PD-L1+}}{\text{Общая область ИК}}$$

Combined positive score

$$\text{CPS} = \frac{\# \text{PD-L1 окрашенных клеток (ОК, лимфоциты, макрофаги)}}{\text{Общее \# жизнеспособных ОК}}$$

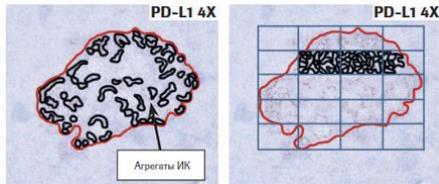


16

16

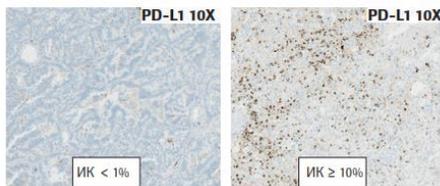
Метод подсчета иммунных клеток

Оценка окрашивания PD-L1 в агрегатах



1. Визуально выделить агрегаты иммунных клеток максимально близко, используя 2- или 4-кратное увеличение
2. Объединить окрашивание агрегатов и оценить долю площади области опухоли, занятой агрегатами иммунных клеток с использованием 2- или 4-кратного увеличения

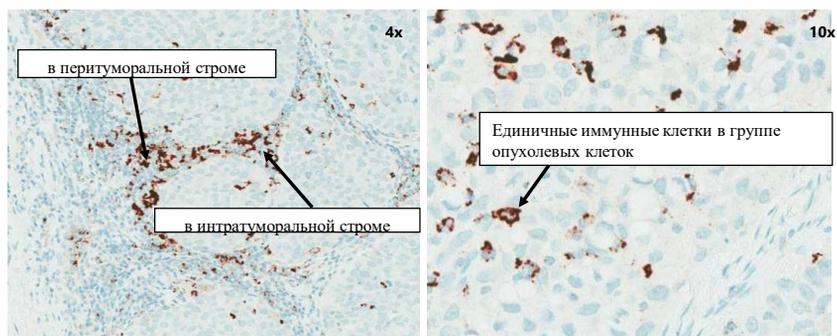
Оценка окрашивания PD-L1 в единичных клетках



Оценка окрашивания в единичных клетках оцениваются на основе плотности распространения отдельных клеток, используя референсные изображения



Пример окрашивания иммунных клеток: Агрегаты vs Единичные клетки



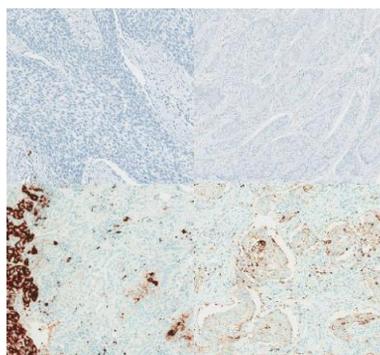
Алгоритм поэтапной оценки образцов при НМРЛ

Этап 1: Оценка окрашивания опухолевых клеток (TC)	Экспрессия PD-L1
Наличие заметного окрашивания PD-L1 мембраны любой интенсивности в $\geq 50\%$ опухолевых клеток	$\geq 50\%$ TC
Отсутствие какого-либо заметного окрашивания PD-L1 (ИЛИ) Наличие заметного окрашивания PD-L1 мембраны любой интенсивности в $< 50\%$ опухолевых клеток.	Перейти к этапу 2
Этап 2: Оценка окрашивания опухоль-инфильтрирующих иммунных клеток (IC)	Экспрессия PD-L1
Наличие заметного окрашивания PD-L1 любой интенсивности в опухоль-инфильтрирующих иммунных клетках, покрывающих $\geq 10\%$ площади области опухоли, занимаемой опухолевыми клетками и связанной с ними интра- и перитуморальной стромой.	$\geq 10\%$ IC
Отсутствие какого-либо заметного окрашивания PD-L1 (ИЛИ) Наличие заметного окрашивания PD-L1 любой интенсивности в опухоль-инфильтрирующих иммунных клетках, покрывающих $< 10\%$ площади области опухоли, занимаемой опухолевыми клетками и связанной с ними интра- и перитуморальной стромой.	$< 50\%$ TC и $< 10\%$ IC

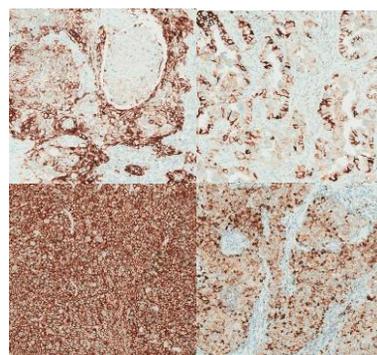


19

Этап 1. Окрашивание опухолевых клеток при НМРЛ



$< 50\%$ опухолевых клеток



$\geq 50\%$ опухолевых клеток



Этап 2

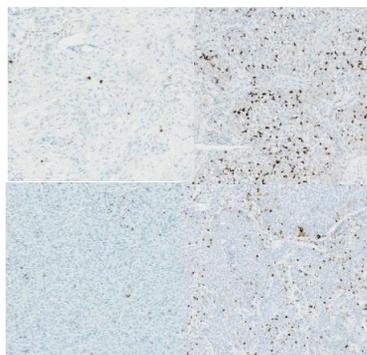


20

Этап 2.

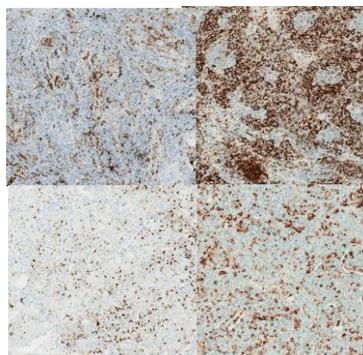
Окрашивание иммунных клеток при НМРЛ

в случае, когда окрашивание опухолевых клеток <50%



<50% опухолевых клеток

<10% иммунных клеток



<50% опухолевых клеток

≥10% иммунных клеток

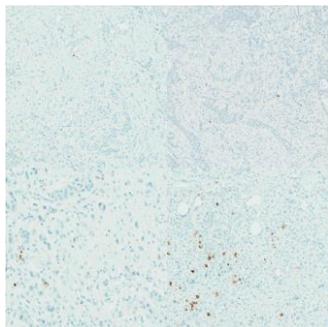


Алгоритм оценки результатов при уротеримальной карциноме

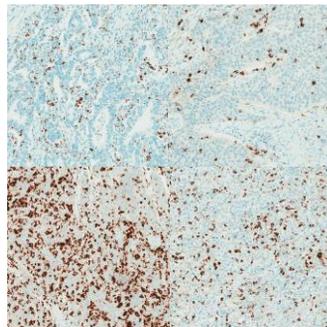
Окраска инфильтрирующих опухоль иммунных клеток (IC)	Экспрессия PD-L1
Отсутствие какого-либо заметного окрашивания PD-L1 (OR) Наличие заметного окрашивания PD-L1 любой интенсивности в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках, покрывающих <5% площади области опухоли, занимаемой опухолевыми клетками и связанной с интратуморальной и прилегающей перитуморальной стромой	< 5% IC
Наличие заметного окрашивания PD-L1 любой интенсивности в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках, покрывающих ≥ 5% площади области опухоли, занимаемой опухолевыми клетками и связанной с интратуморальной и прилегающей перитуморальной стромой	≥ 5% IC



Оценка окрашивания единичных иммунных клеток



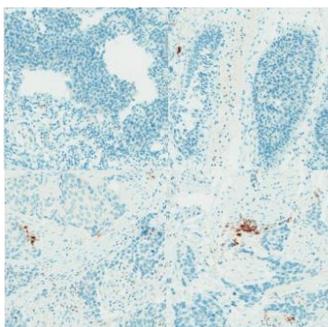
Единичные иммунные клетки
<5% иммунных клеток



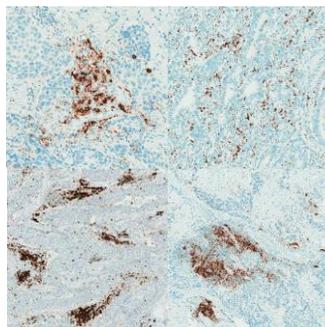
Единичные иммунные клетки
≥5% иммунных клеток



Оценка окрашивания агрегатов иммунных клеток

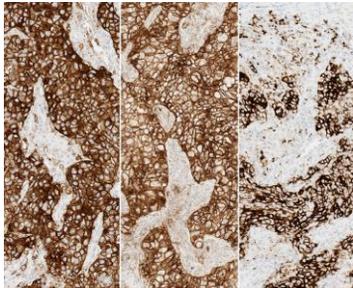


Агрегаты иммунных клеток
<5% иммунных клеток



Агрегаты иммунных клеток
≥ 5% иммунных клеток





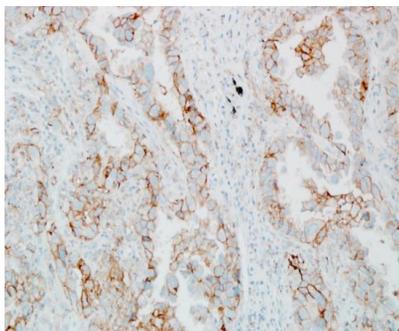
- Общее
- Антитела к PD-L1
- Особенности интерпретации
- Контроль качества



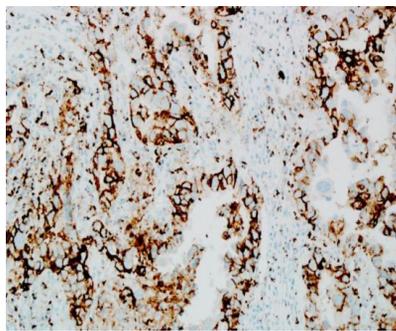
Полностью автоматизированный процесс окрашивания PD-L1



Окрашивание опухолевых и иммунных клеток в НМРЛ: Влияние наличия усилителя сигнала



без усилителя сигнала

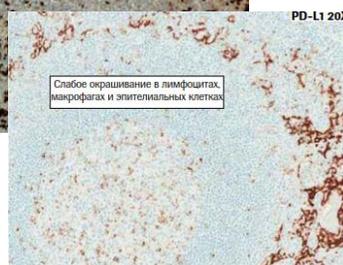
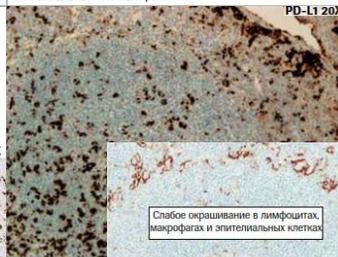
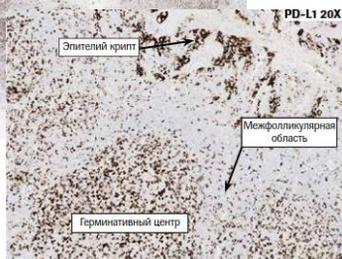
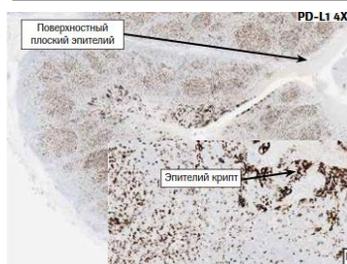


с усилителем сигнала



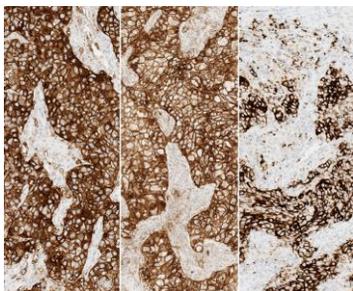
Контрольная ткань

Критерии приемлемости и требования к контрольной ткани миндалин	
Приемлемо	Неприемлемо
Негативные элементы ткани: PD-L1- негативные иммунные клетки PD-L1 в межфолликулярных областях с негативным поверхностным плоским эпителием.	Чрезмерное неспецифическое окрашивание фона, препятствующее идентификации PD-L1 - положительных клеток.
Позитивные элементы ткани: От умеренного до сильного окрашивания PD-L1 в лимфоцитах и макрофагах в герминативных центрах с диффузным окрашиванием в ретикулоподобных эпителиальных клетках крипт.	Слабое окрашивание PD-L1, вплоть до его отсутствия, наблюдающееся в лимфоцитах и макрофагах в герминативных центрах и в ретикулоподобных эпителиальных клетках крипт.



Цифровой раунд по оценке интерпретации PD-L1

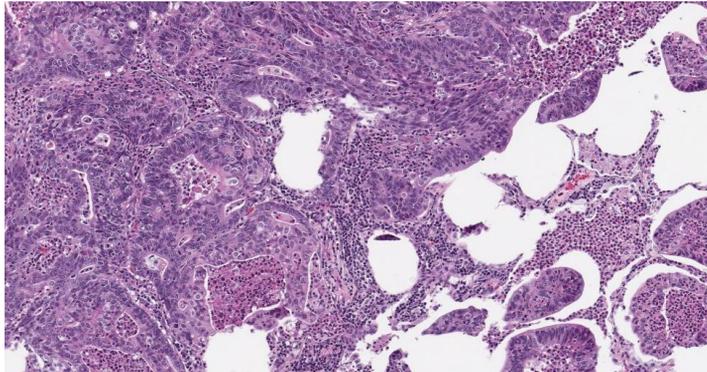
- Интерпретация результатов ИГХ исследования с антителами к PD-L1 клоны 22C3, SP263, SP142
- Определение PD-L1 опухоли по критериям оценки, применяющимся в настоящее время для каждого антитела
- Определение абсолютных показателей (процент TC и IC)



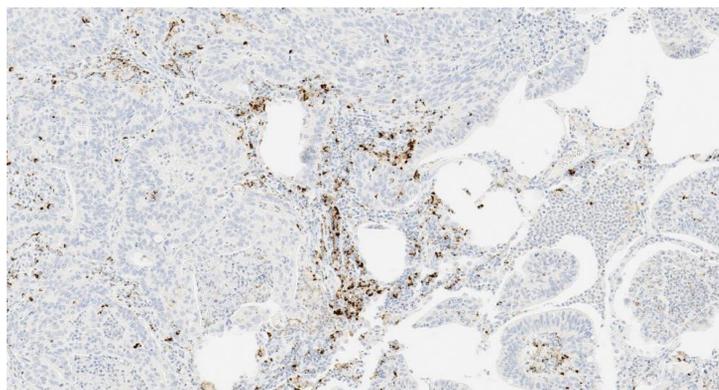
Просмотр слайдов



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 1



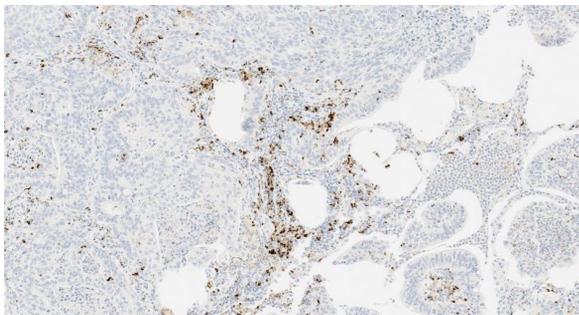
Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 1



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 1

ОБРАЗЕЦ 1

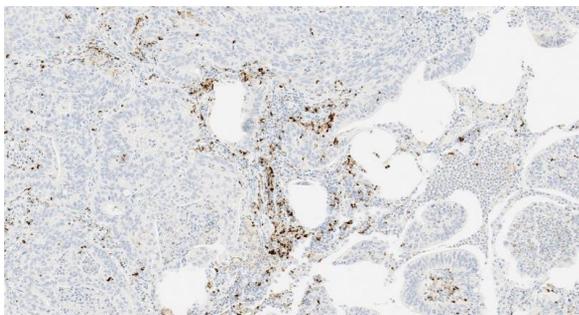
1. <1
2. 1-5
3. 6-10
4. 10-25
5. >25%



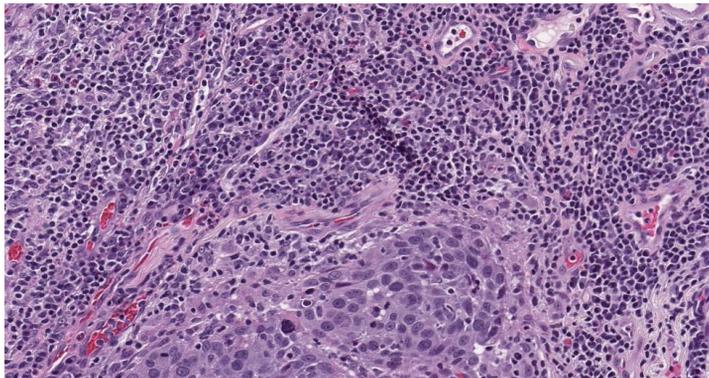
Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 1

ОБРАЗЕЦ 1

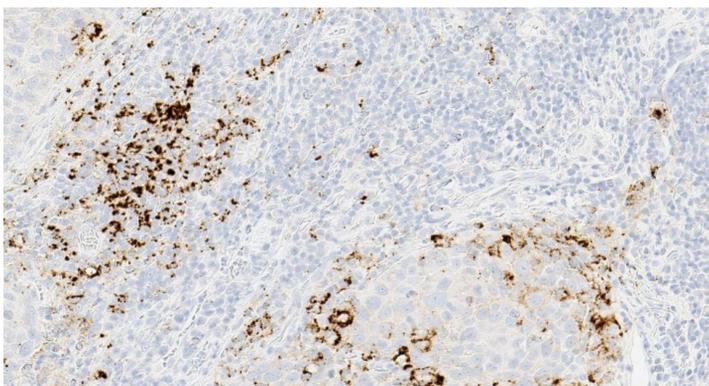
1. <1
2. 1-5
3. **6-10**
4. 10-25
5. >25%



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 2



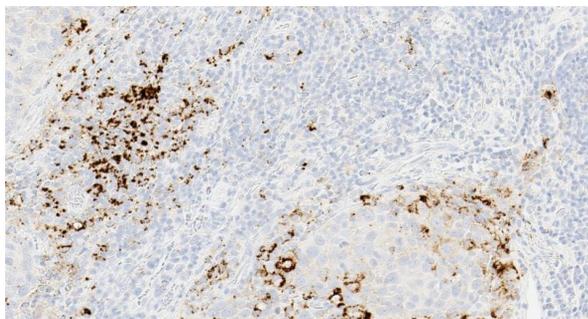
Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 2



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 2

ОБРАЗЕЦ 2

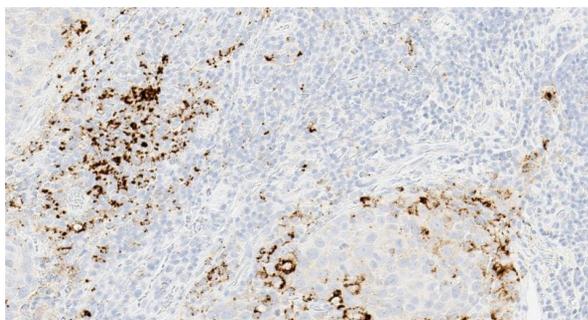
1. <1
2. 1-5
3. 6-10
4. 10-25
5. >25%



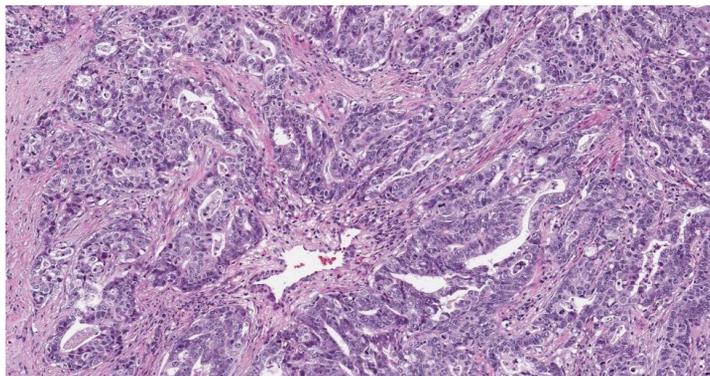
Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 2

ОБРАЗЕЦ 2

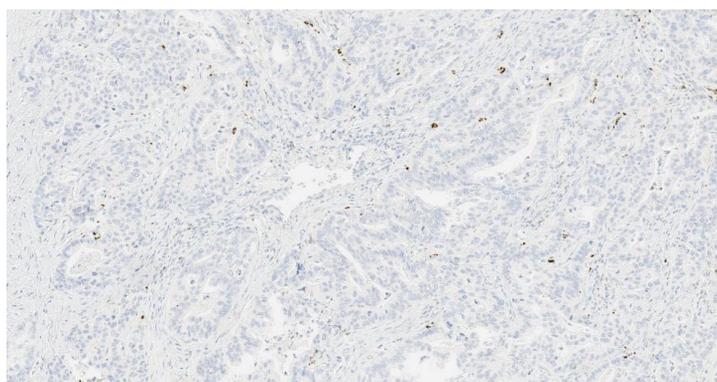
1. <1
2. 1-5
3. 6-10
4. 10-25
5. >25%



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 3



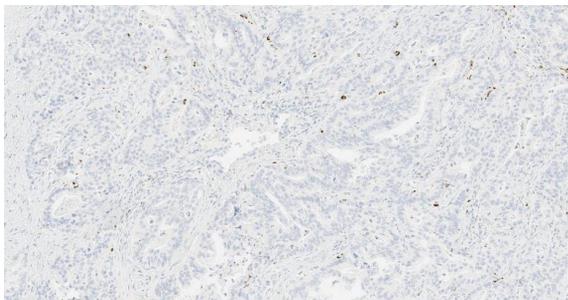
Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 3



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 3

ОБРАЗЕЦ 3

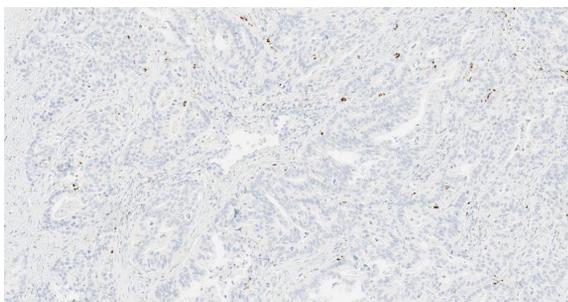
1. <1
2. 1-5
3. 6-10
4. 10-25
5. >25%



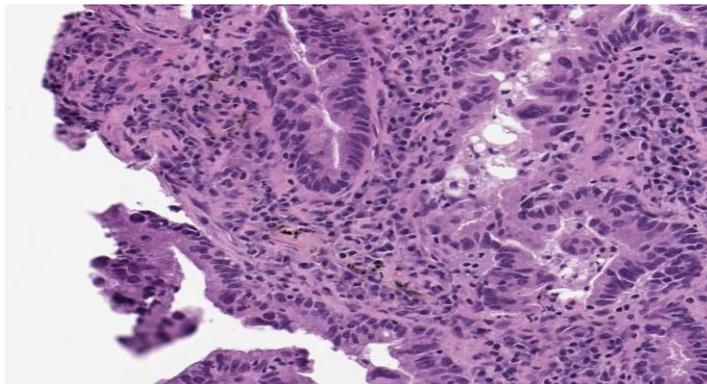
Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 3

ОБРАЗЕЦ 3

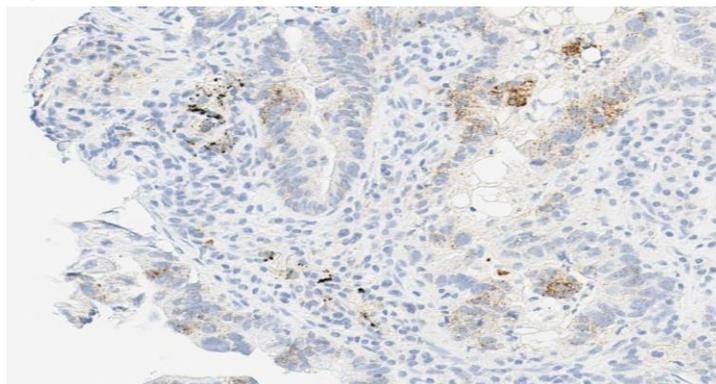
1. <1
2. **1-5**
3. 6-10
4. 10-25
5. >25%



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 4



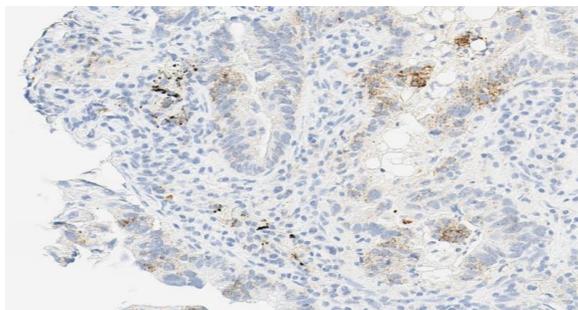
Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 4



Оценка окрашивания иммунных клеток
Образец 4

ОБРАЗЕЦ 4

1. <1
2. 1-5
3. 6-10
4. 10-25
5. >25%



Спасибо за внимание!

