

ОТЗЫВ

официального оппонента Любченко Людмилы Николаевны, доктора медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующей отделом молекулярной генетики и клеточных технологий на диссертационную работу Денисова Евгения Владимировича по теме «Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы. Клинические и молекулярно-генетические особенности» на соискание степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6 Онкология, лучевая терапия

Актуальность темы диссертационного исследования

В настоящее время рак молочной железы - один из лидеров в мире и в РФ по заболеваемости и смертности, даже несмотря на совершенствование диагностики для выявления процесса на ранних стадиях и появившиеся новые модальности лечения. Изучение фундаментальных основ злокачественных новообразований открыло сравнительно новый фактор, в аспекте признания его важной патогенетической значимости, который лежит в основе таких свойств опухоли как резистентность к химиотерапии, клональная эволюция, избегание иммунологически-индуцированных повреждений, опухолевая прогрессия, в виде гематогенного метастазирования, фатально уносящих жизни пациенток. Внутриопухолевая гетерогенность, присущая солидным новообразованиям, практически не изучена в плане улучшения результатов терапии, а также возможности оценки прогноза. Это связано с недостатком знаний о биологической природе гетерогенности, и это сдерживает использование патогенетически значимых подходов в лечении и прогнозе этого заболевания. Диссертант основное место в своей работе посвятил выявлению молекулярных основ феномена гетерогенности и характеристике факторов и подходов, способствующих пониманию ситуации и возможностей воздействия на нее. Актуальность данного исследования трудно переоценить, поскольку в процессе его выполнения автором получены новые сведения о природе феномена гетерогенности, и это дает перспективу для разработки терапевтических подходов с целью повышения эффективности лечения и улучшения прогноза клинического течения указанного заболевания. Целью работы является выявление морфологических, клеточных и молекулярно-генетических факторов, ассоциированных с формированием внутриопухолевой морфологической гетерогенности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и её вкладом в эффективность неoadъювантной химиотерапии и метастазирование. Работа направлена на решение проблемы улучшения результатов лечения онкологических больных на основе разработки подходов персонализированной онкологии, с учетом внутриопухолевой гетерогенности, которая может быть как маркером прогноза, так и потенциальной терапевтической мишенью.

Научная новизна исследования.

В работе используется новый подход по оценке феномена гетерогенности, который ранее не был использован исследователями в этой области, а именно, проведена комплексная характеристика молекулярно генетических особенностей морфологических структур, отражающих внутриопухолевую гетерогенность. Автор применил наиболее современные методы молекулярных исследований, что позволило обозначить приоритет в вопросе установления роли факторов клеточной и молекулярной природы в изучаемом феномене. Автор показал, что молекулярные изменения не носят клонального характера, не связаны с хромосомными повреждениями, при этом для разных видов структур опухоли были свойственны разные проявления, как в плане связи с прогнозом заболевания, так и возможностью применения того или иного сочетания противоопухолевых препаратов при проведении неoadьювантной химиотерапии. Разная молекулярная природа идентифицированных морфологических структур показана при использовании метода секвенирования, при этом автор описал новую (дополнительно найденную) торпедоподобную популяцию клеток, отличную от других морфологических образований и по свойствам, и по характеру ассоциации с метастазированием. Именно в ней были найдены молекулы с перспективой разработки маркеров прогноза клинического течения заболевания.

Теоретическая и практическая значимость

В работе получены приоритетные данные о природе внутриопухолевой гетерогенности. Было четко показано, что разные виды морфологических структур являются генетически обособленными и экспрессируют разные факторы, которые определяют биологические свойства указанных структур, и, следовательно, их поведение в условиях роста и прогрессии опухоли. Это позволило выявить трансляционно привлекательные особенности как морфологической так и молекулярной природы. Эти факторы имеют связь с эффективностью терапии и прогнозом заболевания. Резистентность альвеолярных структур связана с экспрессией маркеров стволовых клеток. Показано, что микроокружение отличается функциональным составом и индивидуально у каждого вида структуры. Автором обосновано потенциальное использование целого ряда оригинальных молекул в качестве маркеров предсказания и прогноза течения заболевания. Что очень важно практически, - это установление фенотипа лекарственной резистентности, для той или иной структуры, а также исследование инвазивности и способности к метастазированию.

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

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Денисова Е.В. обусловлена

актуальностью проводимых исследований, корректно сформулированной целью работы и постановкой адекватных задач, которые должны быть решены для ее достижения. Представленная работа включает более 700 пациентов с диагнозом РМЖ, что свидетельствует о достаточном объеме выборок для получения достоверных результатов. Автор обосновал необходимость использования высокотехнологичных методов, включая иммуногисто-химические, транскриптомные, лазерную микродиссекцию, оценку экспрессионных профилей генов интереса для характеристики процессов инвазии, лекарственной резистентности, предсказания эффективности терапии и прогноза клинического течения злокачественного процесса. Важным является корректный дизайн исследований, позволивший достичь ожидаемых результатов. В процессе исследований получены достоверные результаты, характеризующие клеточные и молекулярные события, которые вносят вклад в биологические проявления гетерогенности на уровне активации тех или иных сигнальных путей и взаимодействий. Положения, выносимые на защиту, вытекают из большого массива полученных данных, и отражают все научные находки, вовлеченные в формирование гетерогенности. Высокий уровень достоверности полученных результатов подтверждается также большим числом грантов российских научных фондов, поддержавших эти разработки. По результатам исследований опубликовано 63 работы, в том числе 18 статей в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК РФ. Имеется 2 патента РФ на изобретение, 1 свидетельство о регистрации базы данных. При этом обращает на себя внимание большое количество зарубежных статей в журналах с высоким импакт фактором. Автор докладывал результаты диссертационной работы на многочисленных конференциях, российских и зарубежных. Все это, вместе взятое, обеспечивает обоснованность и достоверность полученных данных и сформулированных выводов.

Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом

Диссертация написана в классическом стиле, представлены все необходимые разделы, включающие подробную характеристику проделанных работ согласно тематике диссертации.

Во «Введении» формулируется цель работы, перечисляется инструментарий для проведения исследований с целью решения поставленных задач. Задачи сформулированы корректно, отвечают цели, и это служит основой для получения достоверных данных, которые определяют уровень связи изучаемых параметров с онкологическим результатом.

В Главе 1 представлены данные литературы о феномене внутриопухолевой гетерогенности, ее разном участии в судьбе опухолей различных локализаций, связи с прогнозом, ответом на химиотерапию. Приведены сведения о взаимодействии клеток опухоли и микроокружения, о

свойствах клеток, способных к инвазии и метастазированию. Приведенные сведения отражают необходимость проведения комплексных исследований гетерогенности у больных раком молочной железы с учетом роли стромально-инфильтративного компонента, эпителиально-мезенхимального перехода, стволовых опухолевых клеток.

В разделе 2 «Материалы и методы исследований» почти на 30 страницах перечислены и охарактеризованы включенные в исследование группы пациентов, составивших более 700 человек, предлагаемая методология и методические подходы, современные и информативные. Хорошо продуманный дизайн исследований позволил получить важные приоритетные данные. Автором использован широкий спектр методик, адекватный для получения ожидаемых результатов, решения задач и подтверждения найденных закономерностей.

Глава 3 «Результаты исследований и их обсуждение» содержит информацию о полученных закономерностях, открытых автором при изучении различных проявлений внутриопухолевой гетерогенности, начиная с пространственного расположения, изучения фенотипического состава, и далее транскрипционных особенностей, которые совместно могут рассматриваться как физиологические и функциональные характеристики, присущие разным типам морфологических структур. Автор изучил взаимодействие опухолевого микроокружения с разными типами структур, на транскриптомном уровне выявил медиаторы, определяющие процессы инвазии и метастазирования, для каждого типа. Поскольку у пациентов применялась неоадьювантная химиотерапия, целесообразным было посмотреть влияние гетерогенности на результаты лечения, а также оценить транскриптомные особенности резистентных структур, их связь с эффективностью химиотерапии. Эти данные представляют прямой интерес для поиска медиаторов и генов, вовлеченных в развитие химиорезистентности, и потенциальных маркеров, как для предсказания химиорезистентности, так и процесса инвазии, а, следовательно, риска метастазирования. Выявленные маркеры, ассоциированные с неотвечаемостью на химиотерапию, также как маркеры, связанные со способностью к инвазии, были обоснованно представлены как факторы, подлежащие валидации на предмет использования в качестве прогностических и предсказательных маркеров. Изучение опухолевого микроокружения показало превалирование макрофагов у солидных и дискретных структур, по-видимому, это согласуется с данными о корреляции отсутствия ответа на ХТ, высокой химиорезистентности, ассоциации с метастазированием, так как обычно опухолевые макрофаги способствуют опухолевой прогрессии. Определение конкретных маркеров таких взаимоотношений создает возможность их использования для предсказания и регуляции зависимых процессов. Процесс метастазирования зависит от инвазивных свойств клеток опухоли для выхода в кровотоки, поэтому автор выявил особенности разных структур в плане инвазии, а также приобретения

мезенхимального фенотипа, важного для метастазирования. В процессе выполнения исследований были найдены основания для позиционирования еще одного типа структур - торпедоподобного типа. Его изучение привело к выявлению молекулярных маркеров для оценки риска метастазирования и ответа на терапию. В целом, полученные оригинальные данные явились основой для создания платформы по изучению факторов прогноза и предсказания эффективности химиотерапии с учетом закономерностей, определяемых феноменом гетерогенности, для разных локализаций злокачественного процесса. В диссертации после главы собственных результатов приведен раздел «Заключение», в котором обобщен анализ полученных данных, проведены сопоставления с данными других исследователей. Работа завершена полноценными выводами, отражающими научную фактуру и определяющими дальнейшие разработки для решения вновь возникших вопросов.

Автореферат по содержанию полностью соответствует диссертации, замечаний к автореферату нет.

Рекомендации по использованию полученных данных.

В процессе исследований на основе проведения секвенирования РНК были установлены белковые молекулы, связанные с течением заболевания и возможностью прогноза, это требует дальнейшей оценки эффективности указанных маркеров в онкологической практике. Кроме этого, полученные фундаментальные данные могут прояснить закономерности взаимоотношений опухоли и микроокружения, которое не будет ограничено маркерной значимостью, но будет ценно и перспективами поиска новых терапевтических мишеней.

Замечания и вопросы

1. По какому принципу набирали группы пациентов в исследование: критерии включения и исключения.
2. Для каких пациенток можно будет использовать предложенные Вами потенциальные маркеры прогноза.
3. Каким методом оценивали транскриптомный профиль опухолевых клеток?

Заключение.

Представленная диссертационная работа посвящена одной из важнейших проблем медицины - повышению эффективности лечения онкологических больных. Она построена на исследованиях, результаты которых позволили дать характеристику биологического поведения внутриопухолевой гетерогенности и установить ее связи с клиническим течением злокачественного процесса. Используя наиболее современные высокотехнологичные методы исследований, автор показал, что проявления гетерогенности не связаны с хромосомными нарушениями, но очень

пластичны и могут определяться на основе транскрипционных изменений в опухолях в том или ином микроокружении. Логика работы очень четко выражена – от установления морфологической природы (структурно обособленные образования) до прояснения их молекулярной природы, как транскрипционно обособленных популяций клеток, обладающих разными функциональными свойствами, и определяющими закономерности резистентности к химиотерапии, и механизмы инвазии и метастазирования. Это важный факт, открывающий возможности регуляции прогрессии опухоли с использованием патогенетически обоснованных воздействий. Положения, выносимые на защиту, отражают основные значимые результаты, среди них есть новые важные сведения как в фундаментальном плане, так и для дальнейшего обоснования их трансляции в клинику. Показано участие стволовых клеток в формировании гетерогенности, при этом становится понятной пластичность этого процесса, так как известно регуляторное действие цитокинов на клетки со свойствами стволовых или находящихся в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода. Формирование гетерогенности обусловлено проявлениями свойств самих опухолевых клеток наряду с характеристиками микроокружения, также различными для разных морфологических структур. Можно говорить о существенных перспективах использования полученных результатов для изучения механизмов инвазии и метастазирования, чувствительности к лекарственной терапии. Обнаруженные молекулярные маркеры на торпедоподобной структуре позиционируются как потенциальные маркеры для прогноза клинического течения заболевания.

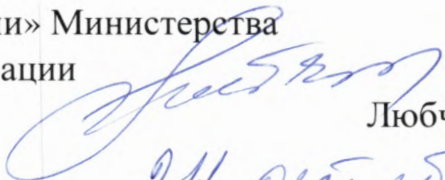
Таким образом, диссертационная работа Денисова Евгения Владимировича «Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы. Клинические и молекулярно-генетические особенности» является законченным научным квалификационным трудом, в котором получена совокупность фундаментальных данных о механизмах формирования внутриопухолевой гетерогенности рака молочной железы, ее участия в метастазировании и химиорезистентности опухоли, что открывает новое направление разработки маркеров и мишеней для контроля опухолевой прогрессии.

В целом, по своей актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, полученных на современном методологическом уровне, диссертационная работа Денисова Е.В. соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Даю свое согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет Д 21.1.033.01.при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68).

Официальный оппонент

Заведующая отделом молекулярной генетики и клеточных технологий
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
доктор медицинских наук



Любченко Л.Н.
«24 октября» 2022 г.

Подпись доктора медицинских наук Любченко Людмилы Николаевны
«заверяю»

Ученый секретарь
ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский центр радиологии»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации



Жарова Е.П.

2022 г

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3
тел.: 8 (495) 150-11-22
e-mail: mail@nmirc.ru
сайт: <https://nmicr.ru/>