

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Ибрагимовой Марины Константиновны «Изменение генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неоадьювантной химиотерапии: связь с метастазированием», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология (биологические науки)

Рак молочной железы (РМЖ) на сегодняшний день продолжает занимать лидирующую позицию в структуре онкологической заболеваемости и смертности женского населения, как в России, так и в мире. Несмотря на очевидный прогресс в области диагностики и лечения, диссеминированный РМЖ остается неизлечимым заболеванием, в связи с чем основной задачей лекарственного лечения больных с ранними стадиями РМЖ является предотвращения развития отдаленных метастазов. Однако, с другой стороны, неоадьювантная и адьювантная терапия заранее предусматривают «перелечивание» значимой части больных, которые не имеют точки приложения для них (микрометастазов). Более того, в связи с тем, что в процессе адьювантной терапии макроскопические проявления опухоли отсутствуют мы не в состоянии оценить эффективность лечения до факта реализации микрометастазов (при резистентности к адьювантной терапии) или отсутствия такового. К сожалению, существующие в настоящее время методы прогнозирования риска развития метастазов, чувствительности к терапии крайне неточны, а имеющиеся методы с высокой прогностической способностью применимы лишь к весьма ограниченному контингенту больных РМЖ – люминальные опухоли без поражения лимфатических узлов. Таким образом, у большинства больных мы вынуждены проводить лечение «вслепую», руководствуясь лишь наиболее общими и крайне неточными факторами «группового» прогноза – размер опухоли, число пораженных лимфатических узлов, иммуногистохимический суррогатный подтип опухоли. Это доказывает необходимость разностороннего изучения механизмов развития и инициации метастазирования.

Важно понимать, что молекулярные механизмы метастазирования напрямую связаны с возникновением генетических нарушений, при этом потенциально дополнительные генетические изменения в опухоли могут происходить и под влиянием химиотерапевтических препаратов. Безусловно, в общей популяции больных польза от использования (нео)адьювантной терапии доказана многочисленными исследованиями, однако нельзя исключить, что у некоторых больных изменения в геноме, происходящие под воздействием цитостатиков, могут оказаться критичными с точки зрения эволюции опухоли, позволяя ей приобретать дополнительные факторы патогенности (в т.ч. и способность к метастазированию). Поиск и детальная характеристика таких генетических изменений, определяющих как клиническое течение, так и прогноз исхода заболевания, очевидно, является одним из приоритетных направлений исследований.

Диссертационная работа Ибрагимовой М.К. посвящена идентификации генетических изменений (делеций и амплификаций хромосомных регионов), возникающих опухолевой ткани РМЖ под действием неoadъювантной химиотерапии и их ассоциации с гематогенным метастазированием.

Актуальность темы диссертации.

При формулировке актуальности диссертационной работы автором приведены немногочисленные, но в то же время интересные данные зарубежных исследований о том, что неoadъювантная химиотерапия, примерно в 20% случаев может стимулировать появление дополнительных мутаций, которые потенциально связаны с метастазированием и прогрессией заболевания. Автор указывает на необходимость изучения данного феномена с точки зрения клональной эволюции опухоли в процессе лечения. При этом автор отмечает, что изменение количества копий генов - CNA (Copy Number Aberrations) являются одним из главных компонентов мутационного ландшафта опухоли молочной железы, которая относится, к так называемым С-опухольям, и могут легко изменяться под действием внешних факторов. Кроме того, CNA, оказывая самое существенное влияние на экспрессию генов, определяют функциональные возможности опухолевых клеток, в том числе и способность к метастазированию.

Таким образом, целью своей диссертационной работы Ибрагимова Марина Константиновна определила исследование изменения CNA–генетического ландшафта РМЖ в процессе предоперационной химиотерапии и связь этого феномена с метастазированием.

Актуальность данной проблемы не вызывает сомнений, а сформулированная в работе цель представляется достижимой, несмотря на значимый объем анализируемых данных.

Достоверность и новизна выводов и результатов диссертации.

Результаты диссертационного исследования Ибрагимовой М.К. базируются на большом экспериментальном материале. Используемые методы исследования соответствуют поставленным задачам, методы статистического анализа использованы корректно и адекватно поставленным задачам.

Проведенная работа хорошо спланирована и состоит из нескольких логически связанных и обоснованных этапов исследования. Выводы диссертационной работы полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам. Достоверность каждого вывода не вызывает сомнений.

В диссертационной работе содержатся новые научные факты, значимые для развития фундаментальных представлений о молекулярных механизмах гематогенного метастазирования. На первом этапе автором описан CNA-ландшафт люминального В HER2-

негативного подтипа РМЖ до лечения, его связь с основными клинико-морфологическими характеристиками и последующим эффектом неoadьювантной химиотерапии (НХТ). Было показано, что наличие объективного ответа на НХТ (частичная и полная регрессия) наблюдалось при наличии в опухоли большого числа делеций в 9p22.1 и 9p21.3 регионах. Потенциально эти локусы могут выступать в качестве предиктивных маркеров хорошего ответа на НХТ у больных люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ. В обсуждении показаны отличительные особенности CNA-ландшафта опухолей люминального В HER2-негативного подтипа, также проведено сравнение с трижды негативным подтипом (вывод 1).

Далее автором изучено изменение CNA-генетического ландшафта опухоли в процессе НХТ и его связь с метастазированием. Показано статистически значимое снижение частоты встречаемости амплификаций ($p=0,00028$) и делеций после проведения предоперационной химиотерапии ($p=0,0003$). При анализе связи изменения частоты CNA в опухоли в ответ на проводимую предоперационную терапию с безметастатической выживаемостью, было показано, что изменение частоты амплификаций (а не делеций) наиболее значимо ассоциировано с метастазированием ($p<0,00001$). Безметастатическая выживаемость у больных при уменьшении частоты амплификаций под действием предоперационного лечения составляет 100%, у пациенток с отсутствием изменений частоты амплификаций показаны промежуточные показатели выживаемости 79%, а в группе пациенток с увеличением частоты амплификаций в процессе НХТ безметастатическая выживаемость составила всего 8%. При детальном анализе были выявлены регионы возникновения амплификации *de novo* под действием НХТ в последней группе больных: 3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12). В общей группе больных было установлено, что метастазы развивались только у тех пациентов, у которых в остаточной опухоли были амплификации не менее 2 хромосомных регионов из представленного выше списка, при этом при наличии в резидуальной опухоли 1 амплификации, либо их отсутствии, метастазы у пациентов не развивались (вывод 2 и 3).

Важным является этап диссертационной работы по аналитической работе по данным проекта TCGA. В данной части исследования автором была проанализирована связь смертности (по данным ВОЗ) при 17 злокачественных локализациях (с включением 8456 больных) и наличием в опухоли этих больных 2-х и более амплификаций из выявленных автором регионов (3q(26.31-27.1), 5p(15.33-15.2), 6p(25.2-24.2; 21.2-12.2), 7q(11.1-36.3), 8q(11.21-24.3), 9p(24.2-21.2), 10p(15.3-11.1), 10q(21.3-22.2; 25.1-25.2), 12p(13.33-11.22) 13q(12.3-34), 16p(13.3-11.2), 18q(11.1-23) 19p(13.3-12)). Установлен высокий уровень корреляции ($R=0,842$ при $p=0,000011$). Полученный результат указывает на то, что наличие в

опухоли 2-х и более амплификаций идентифицированных регионов при проведении подтверждающих исследований потенциально может стать универсальным прогностическим маркером неблагоприятного исхода заболевания для многих солидных опухолей (вывод 4).

На следующем этапе исследования автором были аннотированы гены, находящиеся в регионах локализации амплификаций, которые возникали у обследованных больных *de novo* под действием НХТ. Описаны часто встречающиеся гены нескольких функциональных систем. Однако, была установлена только одна система, гены которой представлены во всех этих регионах – это система индукции и поддержания стволового фенотипа клеток и самообновления, гены которой называют генами стволовости (*stemness genes*). Автором выделено 48 генов стволовости, которые находятся в данных хромосомных регионах, указаны их функции. Логическим продолжением является проведенное далее исследование экспрессии генов стволовости в опухоли. Было показано, что некоторые неблагоприятные клиникo-морфологические факторы прогноза ассоциированы с повышенной экспрессией генов стволовости в опухоли. Например, при отсутствии лимфогенного метастазирования в опухоли до лечения статистически значимо выше экспрессия гена *OCT3*, а при наличии лимфогенных метастазов в опухоли до лечения статистически значимо выше экспрессия гена теломеразы *TERT*, чем при их отсутствии.

При сравнении уровня экспрессии генов стволовости до лечения и после НХТ у больных с частичной/полной клинической регрессией опухоли и у пациентов со стабилизацией/прогрессированием опухолевого процесса было установлено, что с высоким уровнем достоверности в опухоли после НХТ повышен уровень экспрессии гена *TERT* при стабилизации/прогрессировании опухоли, при этом уровень экспрессии гена *KLF1* в опухоли после НХТ снижается в данной группе больных. При анализе изменения экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы в процессе НХТ установлено, что НХТ статистически значимо повышает экспрессию 4/13 генов стволовости *SNAI2*; *KLF4*; *VIM*; и *SMAD2*.

В заключении на данном этапе работы автором оценена связь уровня экспрессии генов стволовости с безметастатической выживаемостью больных люминальным В HER2-негативным подтипом РМЖ. Было установлено, что до лечения у больных без метастазов гиперэкспрессированы 3/13 генов стволовости (*OCT3*, *BM11* и *FLT3*), у больных с возникшим впоследствии гематогенным метастазированием гиперэкспрессированы 7/13 генов стволовости (*OCT3*, *BM11*, *SNAI2*, *TERT*, *TGFBR1*, *TGFBR1* и *FLT3*). После проведения НХТ у больных без метастазов гиперэкспрессированы 6/13 генов стволовости (*OCT3*, *BM11*, *KLF4*, *TGFBR1*, *TGFBR1* и *FLT3*), а в группе больных с возникшим впоследствии гематогенным

метастазированием гиперэкспрессированы 11 из 13 генов стволовости (кроме *SMAD2* и *KLF1*) (выводы 5 и 6).

Далее в своей работе автор провел сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ люминального В HER2-негативного подтипа в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии. Выявлено, что количество ДЭГ (дифференциально экспрессируемых генов) в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена. После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались более существенно, по 154 ДЭГ. Также при помощи диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются всего по 1 гену -EHD2 (19q13.33). Автор указывает на то, что EHD2 является негативным регулятором миграции и инвазии в клетках РМЖ. В этом же разделе «Результатов исследования и их обсуждения» автором описано изменение транскриптома опухоли молочной железы и статуса амплификации длинного плеча 8 хромосомы (с локусом 8q24), как наиболее распространенной аберрацией числа копий (CNA) при РМЖ в составе которой находится ген стволовости *MYC*. В результате выяснено, что частота амплификации 8q с регионом 8q24 в опухоли больных до лечения составила 37/60 случаев. Из 37 больных амплификация 8q в резидуальной опухоли после проведения НХТ сохранилась у 24/37 пациентов (65%), кроме этого еще у 3 пациентов амплификации 8q в опухоли возникли de novo под действием предоперационной терапии, что показывает относительную химиорезистентность опухолевых клонов с амплификацией 8q. Также показано, что амплификация региона локализации гена *MYC* 8q24 в резидуальной опухоли приводит к повышению экспрессии комплекса генов стволовости. У больных с амплификацией 8q24 после НХТ в 2.1-3.8 раза повышается, по сравнению с пациентами без амплификации 8q24, экспрессия 5/48 *GSK3B*, *MYC*, *GATA3*, *SMAD4*, *SMAD2* генов стволовости и в 2,1-2.3 раза снижается экспрессия генов *TERT*, *BMP6*, *NANOG* (вывод 7).

На заключительном этапе работы автором проведен эксперимент по индукции дедифференцировки (стволовой пластичности) в популяции нестволовых опухолевых клеток in vitro и оценка значения наличия амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9chr, 10p, 10q22.1, 12p, 13q, 16p, 18chr, 19p для его индукции. На клеточных культурах опухоли молочной железы SK-BR-3, MCF-7 и BT-549 было показано, что отсортированные дифференцированные опухолевые клетки CD44-CD24- культур SK-BR-3 и MCF-7, содержащие амплификации генов стволовости были способны к дедифференцировке под действием интерлейкина-6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер. Дифференцированные (CD44-CD24-) опухолевые клетки культуры BT-549, которые не имели амплификаций генов

стволовости и под действием ИЛ6 не образовывали ОСК и маммосфер. Эти результаты показали, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости (вывод 8).

Таким образом, в работе решена важная научная проблема по исследованию механизмов связи изменений CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием. Проведено исследование изменения CNA-генетического ландшафта первичной опухоли до лечения, после неoadьювантной химиотерапии и в гематогенных метастазах, результатом которого стало решение поставленных задач. Полученные в работе приоритетные данные о феномене стволовой пластичности опухолевых клеток, его клиническом значении для метастазирования и механизмах его осуществления, дает возможность приступить к изучению эффективности ингибирования эктопической экспрессии генов стволовости для подавления способности опухолевых клеток к стволовой пластичности и метастазированию. Тем самым возможно обоснование выбора генов стволовости в качестве мишеней для их ингибирования и профилактики метастазирования.

Ценность для науки и практики проведенной соискателем работы

Проведенные соискателем исследования являются важным научным достижением в области онкологии, исследующим механизмы связи изменений CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием.

В результате исследования получены приоритетные данные о приобретении способности к метастазированию при эктопической экспрессии генов стволовости за счет амплификаций их локусов в разных хромосомах опухолевых клеток.

Впервые при исследовании изменения CNA-генетического ландшафта первичной опухоли до лечения и после НХТ было установлено, что появление амплификаций ассоциировано с крайне высоким риском отдаленного метастазирования, а элиминация клонов с амплификациями приводит к благоприятному исходу.

Автором не только впервые установлены хромосомные регионы, которые появлялись в процессе НХТ и были связаны с развитием метастазов с выявлением важности наличия 2-х и более амплификации из обозначенных регионов для реализации гематогенного метастазирования, но и проведена валидация полученного результата по связи частоты 2-х и более амплификаций на большой выборке больных 17 ЗНО (база данных TCGA) со смертностью (по данным ВОЗ) при различных локализациях с высоким уровнем корреляции.

Также впервые было проведено аннотирование генов, находящихся в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием неoadъювантной химиотерапии с выявлением единственной системы, гены которой представлены во всех этих регионах (генов стволовости). Автором была изучена экспрессия генов стволовости опухоли до лечения и после НХТ. Было показано, что как в опухоли до лечения, так и особенно в остаточной резидуальной опухоли после НХТ больных с развившимися впоследствии гематогенными метастазами отмечается гиперэкспрессия почти всех исследованных генов стволовости.

В работе впервые проведено исследование влияние амплификации длинного плеча 8 хромосомы на опухолевый транскриптом, независимо от других молекулярно-генетических признаков. Показано, что амплификация 8q с участием региона 8q24 локализации гена MYC приводит к значительному сдвигу уровня транскрипции большого количества генов именно после воздействия химиотерапии.

Важно, что была проведена валидация полученных результатов в эксперименте по индукции стволовой пластичности в популяции нестволовых опухолевых клеток *in vitro* и оценено значение амплификаций генов стволовости для ее индукции. На 3-х клеточных культурах опухоли молочной железы показано, что отсортированные дифференцированные опухолевые клетки, содержащие ампликации генов стволовости были способны к дедифференцировке под действием интерлейкина-6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер, а дифференцированные опухолевые клетки культуры, не имеющей амплификаций генов стволовости и под действием интерлейкина-6 не образовывали ОСК и маммосфер. Таким образом, доказано, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости.

По результатам исследования автором предложена гипотеза о роли амплификаций генов стволовости в реализации механизмов метастазирования опухолей, которая подробно описана в главе «Заключение».

Таким образом, исследования, приведенные в диссертационной работе Ибрагимовой М.К., важны и с фундаментальной стороны, как источник новых данных и знаний в области молекулярной онкологии и генетики, а также и с практической точки зрения, поскольку данная работа имеет значительные для клинической онкологии результаты, которые в дальнейшем могут быть применены на практике. Полученные результаты внедрены в учебный план автономной магистерской программы «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» Томского государственного университета по курсу «Молекулярная онкология».

Структура диссертации

Диссертация Ибрагимовой М.К. построена классически, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы собственных результатов исследования с их обсуждением, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, состоящего из 477 литературных источников, из них 475 иностранных, а также приложения. Работа изложена на 196 страницах и иллюстрирована 15 таблицами и 37 рисунками.

Во введении изложена актуальность проблемы, обоснована цель исследования и необходимые для ее достижения задачи, сформулирована научная новизна и теоретическое и практическое значение работы. Результаты исследования внедрены в учебном процессе, зарегистрировано 8 баз данных, 2 патента на изобретение.

Работа содержит хорошо структурированный обзор литературы, с приведением научных статей последних лет. Автор не просто констатирует факты изученной литературы, но и приводит их сравнительный анализ, выявляя их неполноту, а иногда и противоречивость полученных данных. Из этого четко вытекает необходимость и актуальность дальнейших исследований для расширения современных представлений по данной тематике. Заключение к литературному обзору в краткой форме подытоживаются проблемы, которые необходимо решить и описываются возможные пути их решения.

Во второй главе диссертационной работы «Материалы и методы» подробно охарактеризована выборка пациентов, приведены клиничко-морфологические характеристики пациентов и имевшихся у них опухолей. Отдельно описаны способ забора, транспортировки и хранения биологического материала, а также методы работы с ним. Работа выполнена на достаточном для получения обоснованных выводов фактическом материале. Подробно представлен комплекс современных методов исследования, которые с успехом решают поставленные задачи. В диссертационной работе использованы разнообразные молекулярно-генетические методы, которые проведены с соблюдением всех необходимых повторов и дублирований, что позволяет не сомневаться в достоверности полученных результатов.

Отдельно стоит отметить сложность и объём методов анализа, выполненных на высоком уровне, что позволяет судить о несомненном качестве выполненной работы. В целом использованный в работе методологический уровень соответствует передовым мировым аналогам для исследований подобного рода и в полной мере обеспечивает фундаментальность научных исследований диссертационной работы.

Эксперименты, приведенные в работе, выполнены на современном научном уровне. Результаты многочисленных экспериментов подробно описаны, хорошо проиллюстрированы. Хотелось бы отметить большой объём экспериментальной работы, тщательность ее

выполнения, что обеспечивает высокую достоверность результатов и выводов диссертационной работы.

В «Заключении» автор обобщил все имеющиеся важные результаты, которые легли в основу 8 выводов, которые экспериментально и статистически обоснованы, содержат конкретную информацию и вытекают непосредственно из полученных результатов.

В целом диссертационная работа написана четко, логично, обоснованно.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты работы Ибрагимовой М.К. опубликованы в 72 печатных работах. Из них 18 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК, из них 12 статей в зарубежной печати, в том числе 6 статей с квартилем Q1 и 4 статьи с квартилем Q2. Кроме того, зарегистрированы восемь компьютерных баз данных, получено 2 патента на изобретение.

Содержание автореферата

В автореферате полностью отражены основные положения диссертационной работы.

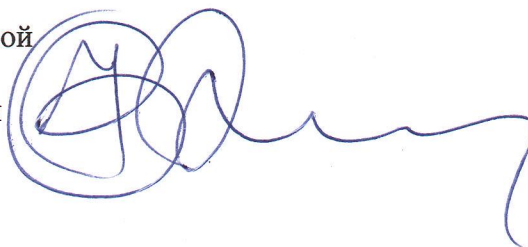
Заключение

Диссертационная работа Ибрагимовой Марины Константиновны. «Изменение генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии: связь с метастазированием» является законченным, самостоятельно выполненным научно-квалификационным трудом, в котором решена важная научная проблема – проведено комплексное исследование механизмов связи изменений CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием. По методическому уровню, актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа М.К. Ибрагимовой представляет значительный вклад в развитие молекулярной онкологии и соответствует лучшим мировым аналогам.

Диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации 24 сентября 2013 г., № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология (биологические науки).

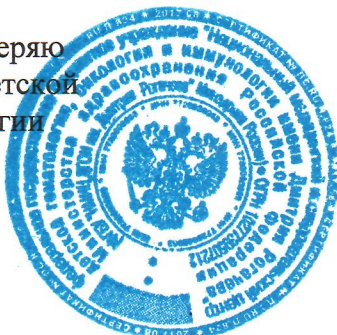
Дата «25» мая 2021 г.

Руководитель отдела междисциплинарной онкологии ФГБУ «НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», д.м.н., профессор



Жуков Н.В.

Подпись д.м.н. Жукова Н.В. удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», д.м.н., профессор



Спиридонова Е.А.

Адрес организации: 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации
E-mail общий: info@fnkc.ru
Официальный сайт: fnkc.ru