

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Ибрагимовой Марины Константиновны
«*Изменение генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе
неoadьювантной химиотерапии: связь с метастазированием*»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 14.01.12 – онкология (биологические науки)

Основной причиной низкой выживаемости и смерти пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций является формирование и рост вторичных очагов опухолевого роста – гематогенных метастазов. При этом, метастазирование представляет собой крайне сложный и многостадийный процесс, механизмы которого являются предметом изучения и в настоящее время. Очень много вопросов в метастатическом каскаде остаются без ответа. Почему у одних пациентов опухоли метастазируют, а у других пациентов нет. Надежные маркеры, для прогноза метастазирования до сих пор неизвестны. Крайне актуальным вопросом является изучение пусковых механизмов инициации и развития гематогенного метастазирования с точки зрения молекулярно-генетических особенностей, в частности, определения генетических изменений, возникающих как спонтанно, так и в результате воздействия химиопрепаратов, которые приводят к приобретению способности к метастазированию. В свете современных представлений о механизмах канцерогенеза, которые связывают со стволовыми клетками, трансформирующимися в опухолевые стволовые клетки, дающие начало всем остальным клеткам опухоли, важнейшим вопросом является исследование стволовой пластичности опухолевых клеток, и в частности стволовой пластичности дифференцированных опухолевых клеток, как основы для приобретения опухолевыми клетками способности к метастазированию.

Диссертационная работа Ибрагимовой М.К. посвящена исследованию механизмов связи изменений CNA-генетического ландшафта (делеций и амплификаций хромосомных регионов) опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием.

Актуальность темы диссертации.

Во введении диссертант достаточно полно и корректно обосновывает актуальность работы. Автор аргументировано указывает на то, что в настоящее время опубликовано множество исследований CNA при раке молочной железы, в том числе и в процессе лечения, однако отсутствуют работы, в которых бы освещался вопрос появления *de novo* CNA под действием терапии и связи их развитием метастазов. Также верно отмечено, что согласно литературным данным, разные опухоли существенно различаются по способности к стволовой пластичности, что как раз определяет злокачественный потенциал опухоли и ее способность к дальнейшей прогрессии. Более того, высказано предположение о том, что способность опухолевых клеток к дедифференцировке до опухолевых стволовых клеток и индукции стволовости определяет злокачественность опухоли и, главное, ее способность к метастазированию.

Автором определена следующая цель работы – исследование механизмов связи изменений CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием.

Таким образом, представленная в работе проблема является актуальной, а цель и поставленные задачи представляются полностью выполнимыми, с учетом большого массива анализируемых данных.

Достоверность и новизна выводов и результатов диссертации.

В диссертационную работу Ибрагимовой М.К. включен большой объем клинического и экспериментального материала. Используемые подходы и методы полностью соответствуют поставленной цели и задачам, в том числе абсолютно корректно выбраны и применены методы статистического анализа.

Представленное исследование грамотно выстроено, состоит из последовательных и обоснованных этапов работы, что точно соответствует 7 поставленным задачам. Полученные в результате проведения исследования результаты полностью соответствуют поставленным задачам и отражены в 8 выводах. Достоверность представленных выводов сомнений не вызывает.

В представленной работе автором отражены принципиально новые научные результаты, являющиеся как основой для развития фундаментальных представлений о молекулярно-генетических механизмах гематогенного метастазирования, так и важным этапом изучения значения стволовой пластичности опухолевых клеток как основы злокачественного потенциала опухоли.

Согласно результатам первого этапа исследования (**вывод 1**), автором изучен CNA-ландшафт опухоли молочной железы люминального В HER2-негативного подтипа до лечения в зависимости от ответа на неoadьювантную химиотерапию (НХТ) и основных клинико-морфологических параметров. В результате автором обозначены потенциальные маркеры хорошего ответа на НХТ у больных РМЖ и проведено сравнение особенностей CNA-ландшафта опухолей люминального В HER2-негативного подтипа и трижды негативного подтипа РМЖ.

На 2-х следующих этапах работы (**вывод 2, вывод 3**) диссертантом проанализировано изменение CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ и метастазирование. Было подтверждено статистически значимое снижение частоты встречаемости CNA после проведения предоперационной химиотерапии. Показано, что изменения частоты амплификаций ассоциировано с безметастатической выживаемостью. При этом, если под действие НХТ в опухоли появлялись новые ампликации, то у таких пациентов, практически со 100% вероятностью образовывали метастазы. Были установлены хромосомные регионы, в которых ампликации под действием НХТ появлялись *de novo*: 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). Кроме того, наличие в остаточной резидуальной опухоли амплификаций не менее 2 хромосомных регионов из этого списка было ассоциировано с метастазированием.

Далее автором проведен комплексный анализ по данным проекта TCGA (**вывод 4**). Так, на этом этапе работы проанализирована связь смертности, по данным ВОЗ, при 17 злокачественных солидных новообразованиях локализациях и частоты 2-х и более амплификаций выявленных регионов, возникающих *de novo* под действием НХТ из указанного выше списка. В результате был установлен высокий уровень корреляции ($R=0,842$ при $p=0,000011$), что позволило диссертанту сделать вывод об универсальности прогностического значения амплификаций идентифицированных регионов как фактора неблагоприятного исхода заболевания для большинства опухолей.

На пятом и шестом этапах работы (**вывод 5, вывод 6**) автором были аннотированы гены, находящиеся в регионах локализации амплификаций *de novo*, возникающих под действием предоперационного лечения. Единственным объединяющим фактором гены, представленные во всех этих регионах являлась принадлежность к системе индукции и поддержанию стволового фенотипа клеток и самообновления или гены стволовости. Автором выявлено 48 генов стволовости, которые находятся в упомянутых регионах, проведено описание их функций. Далее проведено исследование экспрессии 13 генов стволовости в опухоли, и установлено, что повышенная экспрессия данных генов в опухоли ассоциирована с неблагоприятными клинико-морфологическими факторами прогноза и метастазированием, после НХТ у больных с развившимися впоследствии гематогенными метастазами отмечается гиперэкспрессия почти всех исследованных генов стволовости.

В своей работе автор проведен полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе НХТ (**вывод 7**). В результате сравнения экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения предоперационной химиотерапии было выявлено увеличение количества дифференциально-экспрессируемых генов (ДЭГ) после проведения НХТ - 24 и 154 ДЭГ, соответственно. Также в этой части работы диссертантом описано изменение транскриптома опухоли молочной железы и статуса амплификации длинного плеча 8 хромосомы (с локусом 8q24, где находится ген стволовости MYC) в процессе предоперационной химиотерапии, связь с эффектом НХТ и экспрессией генов стволовости. Показано, что амплификация региона 8q24 в резидуальной опухоли приводит к повышению экспрессии комплекса генов стволовости, в частности, у больных с амплификацией 8q24 после НХТ в 2-4 раза повышается, по сравнению с пациентами без амплификации 8q24, экспрессия 5/48 (*GSK3B*, *MYC*, *GATA3*, *SMAD4*, *SMAD2*) генов стволовости, при этом экспрессия 3/48 генов (*TERT*, *BMP6*, *NANOG*) снижается.

На финальном этапе исследования автором описаны результаты эксперимента по индукции стволовой пластичности в популяции дифференцированных 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 (**вывод 8**). На 3-х клеточных культурах опухоли молочной железы (SK-BR-3, MCF-7 и BT-549) показано, что отсортированные дифференцированные опухолевые клетки CD44-CD24- 2-х культур, содержащих амплификации генов стволовости (SK-BR-3, MCF-7) были способны к дедифференцировки под действием ИЛ6 до опухолевых стволовых клеток с образованием маммосфер. Дифференцированные опухолевые клетки культуры, не содержащей амплификаций генов стволовости (BT-549) под действием ИЛ6 не образовывали ОСК и маммосфер. Автор заключает, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости.

Таким образом, в диссертационной работе Ибрагимовой М.К. решена актуальная научная проблема по исследованию механизмов связи изменений CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием с получением исчерпывающих результатов поставленных в исследовании задач.

Ценность для науки и практики проведенной соискателем работы

Итогом выполнения представленного диссертационного исследования явились важнейшие фундаментальные результаты по исследованию пусковых механизмов

инициации (в том числе и под действием терапии) и развитию способности к гематогенному метастазированию опухоли молочной железы, в основе которой лежит стволовая пластичность дифференцированных опухолевых клеток.

Важно отметить, что автором впервые были получены несколько актуальных и важных результатов:

Во-первых, при исследовании изменения CNA-генетического ландшафта первичной опухоли до лечения и после НХТ было показано, что появление амплификаций ассоциировано практически со 100% гематогенным метастазированием, а элиминация клонов с амплификациями приводит к благоприятному исходу.

Во-вторых, диссертантом установлены хромосомные регионы, которые появлялись в процессе НХТ и были связаны с развитием метастазов и показана важность определения наличия 2-х и более амплификации для реализации гематогенного метастазирования

Также на внушительной выборке пациентов по данным базы TCGA (более 8000) с 17-ю типами солидных новообразований валидирован результат по связи частоты 2-х и более амплификаций со смертностью (по данным ВОЗ) с высоким уровнем корреляции.

Новейшими данными также является получение автором сведений при аннотировании генов, расположенных в регионах локализации амплификаций, возникающих под действием предоперационной терапии: выявлены и описаны гены стволовости - система, гены которой представлены во всех изучаемых регионах. Более того, диссертант представляет исчерпывающие данные по анализу экспрессии генов стволовости в опухоли до лечения и после НХТ, включающие проведение микроматричного экспрессионного анализа и исследования влияния амплификации длинного плеча 8 хромосомы на опухолевый транскриптом.

При исследовании стволовой пластичности дифференцированных опухолевых клеток получены приоритетно новые значимые результаты: автором проведен хорошо продуманный эксперимент по индукции стволовой пластичности в популяции нестволовых опухолевых клеток *in vitro* и оценке значения наличия выявленных амплификаций для ее индукции. Таким образом, диссертантом проведена заключительная валидация полученных результатов, где определено, что способность дифференцированных опухолевых клеток к стволовой пластичности и потенциальной возможности формирования метастатических колоний, определяется наличием в их геноме амплификаций локусов генов стволовости.

Особого внимания заслуживает глава «Заключение». Именно в этом разделе автором предложена собственная гипотеза о роли амплификаций генов стволовости в реализации механизмов гематогенного метастазирования опухолей, разработанная и описанная по совокупности полученных в результате проведения диссертационного исследования результатов.

Таким образом, проведенное в представленной работе исследование механизмов связи изменений CNA-генетического ландшафта (делеций и амплификаций хромосомных регионов) опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием имеет полноценную научную значимость, как с фундаментальной точки зрения, в виде новых приоритетных данных в области молекулярной онкологии, так и с практической стороны – полученные маркеры для оценки способности опухоли к метастазированию могут быть использованы для определения целесообразности назначения предоперационной химиотерапии и оценки ее эффективности, что в дальнейшем позволит персонализировать назначение предоперационной химиотерапии больным раком молочной железы.

Дополнительной значимостью обладают разработанный автором патент RU № 2682879 от 22 марта 2019 г., 8 баз данных об изменениях генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ и внедрение результатов собственного исследования в учебный план магистерской программы «Трансляционные химические и биомедицинские технологии» НИ ТГУ по курсу «Молекулярная онкология».

Структура диссертации

Структура диссертационной работы Ибрагимовой М.К. традиционна. Работа состоит из введения, трех глав (обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы результатов исследования и их обсуждения), заключения, выводов, библиографического указателя, включающего 475 зарубежных и 2 российских литературных источников, и приложения к представленной работе. Диссертация изложена на 196 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 37 рисунков.

Во введении автором показана актуальность диссертационного исследования, четко прописаны цель и задачи, сформулирована научная новизна излагаемой работы, ее фундаментальность и практическая значимость. Представлены основные положения работы, которые автор выносит на защиту, обозначены методы исследования. Цель работы сформулирована отчетливо, задачи соответствуют поставленной цели работы и логически из нее вытекают.

Обзор литературы данной работы занимает 35 страниц и начинается с изложения имеющихся представлений о CNA-генетическом ландшафте опухоли молочной железы. Значительная часть литературного обзора посвящена детальному рассмотрению имеющихся современных данных об опухолевых стволовых клетках при раке молочной железы. В представленном отдельном заключении по материалам обзора литературы, Ибрагимова М.К. четко формулирует актуальную научную проблему и обозначает возможные пути ее решения. На большом литературном материале автор показывает, как актуальность исследования изменения CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии, так и вопрос значения опухолевых стволовых клеток для метастазирования рака молочной железы

Глава «Материалы и методы» довольно объемная (около 19 страниц). В этом разделе приведена очень подробная клинико-патологическая характеристика пациентов, с учетом всех общепринятых параметров опухоли молочной железы, также использованные схемы и режимы предоперационной химиотерапии. Особенностью представленной работы, обладающей выраженной биологической направленностью, является использование широкого спектра современных молекулярных методов исследования, включающих в себя выделение РНК и ДНК, оценку экспрессии генов, проведение микроматричного анализа, а также культуральных методов работы. Автор провел четкий статистический анализ полученных результатов с использованием широкого спектра критериев, что доказывает адекватный подход к анализу полученных результатов и показывает несомненную достоверность полученных в работе закономерностей.

В третьей главе описаны результаты собственных исследований, посвященных решению 7 поставленных в исследовании задач. Так, автором подробно описаны и проиллюстрированы результаты по описанию CNA-ландшафта опухоли молочной железы люминального В подтипа до лечения; изменению CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе НХТ и метастазирование; ассоциация амплификаций 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p со смертностью при различных локализациях;

аннотации генов хромосомных регионов 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 10p, 10q, 12p, 13q, 16p, 18q, 19p; исследованию экспрессии генов стволовости в опухоли молочной железы; полнотранскриптомному анализу опухоли молочной железы в процессе НХТ и значению амплификаций генов стволовости для стволового перехода опухолевых клеток *in vitro*. Важно отметить большой объем экспериментальной работы, тщательность ее выполнения, что обеспечивает высокую достоверность результатов и выводов диссертационной работы.

В итоговом «Заключении» к данной работе автором представлено обобщение наиболее значимых результатов, которые легли в основу выводов и положений, выносимых на защиту. В итоге, в представленной научной работе получены не только новые фундаментальные данные о механизмах связи изменений СНА-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadьювантной химиотерапии с метастазированием, но также исследовано и доказано значение амплификаций генов стволовости для стволовой пластичности опухолевых клеток *in vitro*. Полученные автором результаты внедрены в учебный план автономной магистерской программы «Трансляционные химические и биомедицинские технологии Национального исследовательского» Томского государственного университета по курсу «Молекулярная онкология», нашли отражение в 8 базах данных, 2 патентах на изобретение.

Диссертацию завершают 8 выводов. Выводы в целом соответствуют задачам работы, аргументированы, информативны, сформулированы грамотно и вытекают непосредственно из фактического материала работы.

В списке литературы представлены самые современные отечественные и зарубежные источники научной информации, подавляющее большинство из которых - иностранные.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты, положения и выводы диссертации широко представлены автором на научных конференциях и симпозиумах российского и зарубежного уровня, отражены в научных публикациях - 72 печатные работы (из них 18 статей опубликовано в ведущих рецензируемых научных российских журналах, включенных в Перечень изданий, рекомендованных ВАК, в том числе 12 статей в зарубежных журналах, 6 из которых Q1).

Особо следует отметить грантовую поддержку исследований в рамках фондов РФФИ и РФФИ, что указывает на высокий уровень и социальную значимость работы.

В рамках дискуссии по выполненному исследованию, прошу ответить диссертанта на следующие вопросы:

*Есть ли закономерности в отношении хромосомных регионов, в которых под действием НХТ появлялись амплификации *de novo* согласно Вашему исследованию? Чем это можно объяснить?*

Можно ли предположить способы достижения селективного эффекта НХТ с целью снижения, но не возникновения изменений генома после НХТ?

Содержание автореферата

В автореферате полностью отражены основные положения диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Ибрагимовой М.К. «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 исследование механизмов связи изменений СNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии с метастазированием и определено ключевое звено обуславливающее приобретение способности к метастазированию – стволовая пластичность дифференцированных опухолевых клеток, за счет амплификаций локусов генов стволовости. По методическому уровню, актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа М.К. Ибрагимовой 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 автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.12 – онкология (биологические науки).

21 мая 2021 г.

Заведующая кафедрой патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова ФГБОУ ВО Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, д.м.н., профессор

Рукша Т.Г.



Адрес организации: 660022, Красноярский край, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации
E-mail общий: rector@krasgmu.ru
Официальный сайт: krasgmu.ru