

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, главного научного сотрудника лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей" Министерства здравоохранения Российской Федерации Пинелиса Всеволода Григорьевича на диссертацию Филипповой Елены Александровны «Аномальная экспрессия и аберрантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной железы и яичников», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

### *Актуальность темы исследования.*

Диссертационная работа Филипповой Елены Александровны «Аномальная экспрессия и аберрантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной железы и яичников» является актуальной именно потому, что рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных видов рака в России среди женского населения. В мире ежегодно выявляют более 1 млн. случаев первичного РМЖ. Рак яичников (РЯ) также характеризуется высокими показателями смертности, связанными с выявлением заболевания на поздних стадиях, осложненных метастазированием в лимфатические узлы, брюшину и отдаленные органы. Несмотря на интенсивные исследования, проблема возникновения, механизмов развития, лечения и профилактики онкологических заболеваний остается приоритетным направлением современной медицины. Этиологические факторы, предрасполагающие к развитию онкологических заболеваний, известны и достаточно хорошо изучены, среди них важное значение имеют эпигенетические факторы. В связи с этим необходимо отметить, что в последнее время значительно увеличилось число работ, посвященных молекулам, модифицирующим

процесс транскрипции или трансляции. Так, в 2006 году Эндрю Файер и Крейг Мелло получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за изучение РНК-интерференции. Этот механизм регулирует экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Одними из молекул, принимающими участие в РНК-интерференции, являются микроРНК (миРНК). Эти малые некодирующие РНК при специфическом связывании с мРНК-мишенью, вызывающие либо ее деградацию, либо подавляющие трансляцию. миРНК, существуют во всех клетках. К настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии миРНК на метастазирование РМЖ и РЯ. Показано, что в диагностике и прогнозе течения этих заболеваний перспективны профили экспрессии миРНК. Кроме самих миРНК, системную роль в регуляции их генов-мишеней играют факторы, изменяющие уровень их экспрессии, в частности, aberrантное метилирование регуляторных CpG-островков как генов миРНК, так и белоккодирующих генов (БКГ). Метилирование регуляторных последовательностей генов и взаимодействие между миРНК и мРНК генов-мишеней играют важную роль в динамической регуляции активности генов. Аберрации в этих механизмах могут привести к нарушению функционирования клеточных сигнальных путей, что и наблюдается в злокачественных опухолях. В последнее десятилетие продолжает возрастать интерес к поиску новых мишеней метилирования, новых регуляторных миРНК и их генов-мишеней, вовлеченных в онкогенез. Благодаря таким исследованиям достигнут прогресс в персонализированной терапии многих злокачественных опухолей. Именно поэтому, диссертационное исследование Филипповой Е.А., посвященное изучению эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов при РМЖ и РЯ, является чрезвычайно актуальным.

**Научно-практическая значимость работы определяется установлением следующих основных закономерностей:**

1. Впервые на представительных выборках образцов РЯ и РМЖ построены профили метилирования 6 БКГ (*RASSF1*, *DAPK1*, *APAF1*, *BCL2*, *VIM*, *VAX*) и 11 генов миРНК, имеющих CpG-островки в промоторной области гена.

2. Установлены впервые значимые корреляции между изменениями уровня экспрессии и статуса метилирования. Показана роль aberrантного метилирования в подавлении экспрессии группы БКГ и регуляторных миРНК при РЯ и РМЖ.

3. Определены БКГ и гены миРНК, изменение уровня экспрессии и метилирования которых коррелирует с клиническими, патоморфологическими, гистологическими, иммуногистохимическими и патофизиологическими характеристиками больных РЯ и РМЖ.

4. На основе анализа уровней экспрессии группы БКГ, связанных с апоптозом, и предсказанных регуляторных миРНК при РМЖ определены три прямо или опосредованно взаимодействующие пары миРНК – ген-мишень.

5. Не вызывает сомнения практическая значимость работы, так как полученные результаты вносят весомый вклад в понимание процессов патогенеза РЯ и РМЖ. В результате проведенной работы определены мишени для последующего скрининга лекарственных средств.

6. Полученные в диссертационном исследовании данные имеют не только теоретическое, но и прикладное значение, так как открывают новые возможности для улучшения диагностики и коррекции проводимого лечения.

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

Обоснованность научных положений и выводов подтверждается достаточным объемом выборки биологического материала (165 пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом «рак молочной железы» / «рак яичников») и применением современных молекулярно-генетических методов, адекватной статистической обработки. Материалы и методы исследования полностью соответствуют поставленной цели и задачам. Представленное диссертационное исследование имеет четкую, логичную структуру. Изложены как литературные данные по исследуемой проблеме, так и результаты собственного исследования. Выводы соответствуют цели и задачам исследования и отражают основные положения работы. По теме диссертации опубликовано 26 работ, из которых 2 статьи в реферируемых зарубежных журналах и 14 в российских изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 6 тезисов в реферируемых зарубежных журналах. Результаты работы Филипповой Е.А. неоднократно были доложены на российских и международных конференциях и форумах с участием представителей как экспериментальных лабораторий, так и практикующих врачей. Филиппова Е.А. является соавтором патента по теме диссертации. Автореферат отражает основные положения диссертации.

Выявление аномальной экспрессии и/или метилирования БКГ и миРНК делает их перспективными в изучении механизмов канцерогенеза молочной железы и яичников. Найденные потенциально взаимодействующие пары миРНК – мРНК ген-мишень определяют новые возможные звенья в генных сетях РМЖ. Полученные результаты и их внедрение будут способствовать индивидуализации планирования программ лечения при РМЖ и РЯ. На основании полученных данных по метилированию генов миРНК и БКГ были предложены диагностические панели с высокой чувствительностью и специфичностью и показателем

AUC близким к 0.95, включая ранние стадии онкологического процесса, а также панель для прогнозирования метастазирования РЯ.

*Содержание, оформление и объем диссертации.*

Диссертация Филипповой Е.А. построена по традиционной схеме: изложена на 134 страницах машинописного текста, хорошо иллюстрирована 15 таблицами и 36 рисунками, состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, содержит главу с описанием материалов и методов исследования, главу с результатами и обсуждением, выводы и список литературы, который состоит из 182 зарубежных и 40 отечественных источников.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК. Содержание диссертации соответствует специальности 14.03.03 - патологическая физиология.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность проводимого исследования, четко формулирует цель и задачи, основные положения, выносимые на защиту, приводит данные о научной новизне, теоретической и практической значимости работы, личном вкладе автора, апробации работы и публикациях по теме диссертации.

В первой главе, посвященной обзору литературы, представлен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Первый раздел посвящен общим закономерностям канцерогенеза. Во втором разделе большое внимание уделяется системе апоптоза, как естественного барьера на пути злокачественного перерождения клетки, а именно молекулярно-генетическим аспектам путей апоптоза, а также подробному описанию исследованных в работе генов, участвующих во внутреннем и внешнем путях апоптоза, и их роли в онкогенезе. Следующий раздел посвящен важной эпигенетической модификации, регулирующей экспрессию генов, метилированию ДНК и ее участию в развитии и прогрессии опухолей. В четвертом разделе дается подробное описание мРНК, как одного из ведущих регуляторов экспрессии генов, а также их роли при различных видах онкологии. В

последующих двух разделах дается актуальная информация об изучаемых видах рака, статистика заболеваемости и смертности, описание видов рака, участие миРНК при данных видах онкологии. В конце обзора сделано заключение, которое подводит читателя к цели и задачам, проводимых диссертантом исследований. Таким образом, обзор литературы дает представление о состоянии проблемы и данной области исследований, включает много ссылок на литературу последних нескольких лет. Это свидетельствует о том, что автор ориентируется в современной литературе по рассматриваемым вопросам.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. В начале главы подробно приведена характеристика опухолевых образцов РМЖ и РЯ, приведены критерии включения и исключения больных. Для исследования автором были отобраны БКГ, ассоциированные с апоптозом, и предположительно их регуляторные миРНК с привлечением биоинформатического анализа ряда баз данных и источников литературы. Подробно описаны методики выделения ДНК и РНК. Автором грамотно подобраны контроли для выполнения экспериментальной работы. Работа выполнена на репрезентативной выборке клинического материала (165 человек). В разделе «Статистическая обработка результатов» приведены используемые методы статистического анализа, соответствующие современному уровню. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете IBM SPSS Statistics 22. Таким образом, работа выполнена на высоком методическом уровне.

В следующей главе «Результаты и обсуждение» автором приведены актуальные и достоверные научные результаты. Филипповой Е.А. показан аномально высокий уровень метилирования промоторных CpG-островков БКГ (*BCL2*, *DAPK1*, *BAX*) и 9 генов миРНК (*MIR-124-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-193a*, *-203a*) в опухолях яичника по сравнению с парной нормальной тканью. При РМЖ, также определены гены с гиперметилированием промоторных CpG-островков: *RASSF1*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, *APAF1*, *MIR-124a-*

1/3, -125b1, -127, -129-2, -148a, -193a, -375, а также показано снижение уровня метилирования гена *BCL2* в опухоли по сравнению с гистологически нормальной тканью молочной железы. Полученные результаты указывают на участие метилирования промоторных районов БКГ и генов миРНК в развитии РМЖ и РЯ. Автором определены БКГ и гены миРНК увеличение уровня метилирования которых статистически значимо коррелирует с клинико-морфологическими характеристиками опухолей, а именно со стадией онкологического процесса, размером опухоли, наличием/отсутствием метастазов в лимфатических узлах и степенью дифференцировки опухолевых клеток. Полученные результаты указывают на участие данных БКГ и миРНК в патогенезе и прогрессии РМЖ и РЯ. При РЯ автором дополнительно проведен анализ метилирования группы генов миРНК в образцах с метастазами в брюшной полости (перитонеальными метастазами). Полученные данные подтвердили участие метилирования группы генов миРНК в эпигенетической модификации ДНК в первичных опухолях во время метастазирования, что важно для понимания молекулярных механизмов развития и прогрессии РЯ. При РМЖ получены новые данные при сопоставлении уровня метилирования и экспрессии БКГ и миРНК с иммуногистохимическими показателями опухолей молочной железы.

Автором получены данные, подтверждающие роль метилирования в подавлении экспрессии группы БКГ и генов миРНК на репрезентативной выборке образцов РЯ и РМЖ.

Определены новые прямо или опосредованно взаимодействующие пары миРНК – мРНК, связанные с регуляцией генов апоптоза при РМЖ. В дальнейшем, полученные результаты, после дополнительных работ *in vitro* и *in vivo* могут быть использованы для создания терапевтических агентов на основе аналогов этих миРНК при РМЖ.

Автором предложены потенциальные диагностические и прогностические панели маркеров для РЯ и РМЖ, основанные на полученных данных по гиперметилированию генов миРНК и БКГ, идентифицированы

наборы новых генов миРНК с диагностическим и прогностическим потенциалами, которые необходимы для более раннего выявления РЯ и РМЖ и коррекции лечения.

Обсуждение результатов проведенного исследования изложено в 3 главе «Результаты и обсуждение». Автор, основываясь на сопоставлении полученных результатов и данных современной литературы, анализирует и аргументированно обосновывает данные о системной роли метилирования в подавлении экспрессии генов миРНК в опухолях РМЖ и РЯ. Автор обсуждает полученные данные о роли метилирования исследованных БКГ и генов миРНК в патогенезе и прогрессии РЯ и РМЖ, которые находят подтверждение в данных зарубежной литературы. Следует подчеркнуть, что обсуждение полученных результатов основано на анализе современной литературы, а также убедительно аргументировано.

На основании полученных экспериментально данных сформулировано 6 выводов, в которых суммированы результаты исследований. Выводы диссертационной работы полностью соответствуют цели и задачам исследования, и полностью обоснованы.

Принципиальных замечаний нет. Вызывает вопрос: почему опыты с трансфекцией мимика *has-miR-124-3p*, которые свидетельствуют о доказательности роли этой *miR*, отсутствуют в результатах и выводах.

#### ***Заключение.***

Диссертационная работа Филипповой Елены Александровны «Аномальная экспрессия и аберрантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной железы и яичников» представляет собой завершённую научно-квалификационную работу.

По объёму проведенного исследования, актуальности решаемых задач, новизне, научному и практическому значению, методическому обеспечению и статистическому анализу полученных результатов, диссертационная работа Филипповой Елены Александровны полностью соответствует требованиям, предъявляемым пунктом 9 «Положения о присуждении ученых степеней»,



утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842, в редакции постановления Правительства РФ от 28.08.2017г. №1024, а её автор, Филиппова Елена Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук,  
профессор, гл.н.с. лаборатории нейробиологии  
и основ развития мозга Федерального государственного  
автономного учреждения "Национальный медицинский  
исследовательский центр здоровья детей"  
Министерства здравоохранения РФ

В.Г. Пинелис

Подпись В.Г. Пинелиса заверяю

Ученый секретарь ФГАУ

"НМИЦ здоровья детей"

Минздрава России, к.м.н.



А.Г. Тимофеева

« 12 »

02

2020 г.

Федеральное государственное автономное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей" Министерства здравоохранения Российской Федерации 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1, телефон: +7(499) 134-30-83 e.mail: director@nczd.ru сайт: <http://nczd.ru>