

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Цуканова Алексея Сергеевича на диссертацию Филипповой Елены Александровны «Аномальная экспрессия и аберрантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной железы и яичников», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

### *Актуальность темы исследования.*

Рак молочной железы (РМЖ) – самый распространенный вид рака у женщин, он составляет 1/10 от всех злокачественных опухолей и считается наиболее частой причиной смерти женщин от онкологических заболеваний. В отличие от РМЖ выявляемого на более ранних стадиях развития опухоли, рак яичников (РЯ) представляет группу крайне агрессивных злокачественных опухолей, которые отличает высокая частота летальных исходов, что обусловлено выявлением заболевания на поздних стадиях. В настоящее время, прогноз заболевания и выбор методов лечения данной патологии основывается на комплексной оценке клинических, морфологических, молекулярно-биологических характеристик патологического процесса, а также степени распространенности процесса. Для РМЖ и РЯ характерны специфические аномальные профили экспрессии белоккодирующих генов (БКГ) и микроРНК (миРНК). В научных работах последних лет было показано, что изменение статуса метилирования CpG-островков промоторных районов в генах-супрессорах и онкогенах, а также изменение уровня экспрессии миРНК являются критическими событиями в формировании злокачественной опухоли. Однако в этих работах не уделено должное внимание оценке взаимосвязи между изменениями уровня экспрессии БКГ и генов миРНК и метилирования их регуляторных областей. С учетом выше сказанного, диссертационное исследование Филипповой Е.А., посвященное пониманию молекулярных особенностей РМЖ и РЯ и их связи с клинико-патофизиологическими характеристиками больных, способно повысить эффективность диагностики и прогноза этих заболеваний, а также закладывает основы для разработки методов персонализированной терапии, и является, таким образом, актуальным и своевременным.

### *Новизна исследования и полученных результатов.*

В данной работе впервые проведено исследование профилей метилирования и экспрессии шести апоптоз-ассоциированных генов (*RASSF1*, *DAPK1*, *APAF1*, *BCL2*, *VIM*, *BAX*) и группы регуляторных миРНК в первичных опухолях молочной железы и яичников. На основании полученных данных Филипповой Е.А. впервые была установлена функциональная роль метилирования в нарушении регуляции данных генов и миРНК при РМЖ и РЯ. Показано, что в основе нарушения экспрессии БКГ, участвующих в апоптозе,

лежат эпигенетические факторы – метилирование промоторных CpG-островков и изменение экспрессии миРНК. Впервые на клинических образцах больных РМЖ установлена статистически значимая обратная зависимость между уровнями экспрессии мРНК про- и анти-апоптозных генов и ряда миРНК. Таким образом, в опухолях молочной железы идентифицированы три прямо или опосредованно, патологически взаимодействующие пары миРНК – мРНК, связанные с нарушением регуляции генов апоптоза. Этот результат в дальнейшем может быть использован для разработки таргетной персонализированной терапии РМЖ. Показано, что aberrантное метилирование исследованных генов ассоциировано с клинической стадией заболевания, размером опухоли и метастазированием. Определены новые прогностические факторы и их комбинации, имеющие высокий диагностический и прогностический потенциал для больных раком яичников и раком молочной железы.

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

Автором четко изложены предпосылки, послужившие основанием к выбору темы диссертационной работы, обоснована цель, корректно сформулированы задачи исследования. Решение поставленных целей проведено на высоком научном и методологическом уровне. Научные выводы, теоретические положения и практические результаты диссертации Филипповой Е.А. базируются на достаточном объеме наблюдений (165 человек), выборе критериев включения и исключения из исследования. Сопоставление результатов исследования с таковыми других авторов дают основания считать, что полученные в работе данные являются новыми и достоверными. В диссертационном исследовании приведено большое количество таблиц и расчетных данных, что позволяет объективно оценивать результаты исследования. Результаты работы Филипповой Е.А. доложены и обсуждены на российских и международных конференциях, съездах и форумах с участием представителей как экспериментальных лабораторий, так и практикующих врачей.

***Практическая значимость работы.***

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 некоторых социально значимых злокачественных опухолей, как рак простаты. Отсутствие эффективной диагностики на ранних стадиях РМЖ и РЯ, а также повышение частоты летальных исходов и устойчивости к терапии при метастазировании показывают необходимость поиска новых молекулярных маркеров для ранней диагностики и прогноза ответа на лечение при РМЖ и РЯ.

В результате проведенного исследования определены наборы генов миРНК и БКГ, имеющие диагностический и прогностический потенциал. Сформированы новые системы маркеров на основе метилирования генов миРНК для диагностики и прогноза метастазирования РЯ с высокой чувствительностью и специфичностью. На основе метилирования генов миРНК и БКГ разработан метод диагностики РМЖ с высокой чувствительностью и специфичностью и показателем AUC близким к 0.95, включая ранние стадии онкологического процесса. Определены молекулярные факторы, связанные с клиничко-патофизиологическими и иммуногистохимическими характеристиками прогрессии заболевания (стадией онкологического процесса, степенью дифференцировки опухолевых клеток, размером опухоли, наличием или отсутствием метастазов в лимфатических узлах или отдаленных органах, показателями гормональной зависимости (Her2/neu и PR) и пролиферации раковых клеток (Ki67)). Оценка этих молекулярных изменений полезна для прогноза течения этих заболеваний. Определение гиперметилированных и инактивируемых в опухолях онкосупрессорных генов и миРНК и их взаимодействий может лечь в основу разработки новых мишеней и новых лекарственных средств для таргетной и персонализированной терапии рака.

*Содержание, оформление и объем диссертации.* Диссертация построена по классическому типу: изложена на 134 страницах компьютерного текста, включает 15 таблиц и 36 рисунков, 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.

Во введении автором обоснован выбор темы исследования; формулировка цели и задач исследования соответствует теме диссертации. В этом разделе отражена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены основные положения, выносимые на защиту, личный вклад автора.

Обзор литературы содержит все необходимые сведения о предмете исследования и служит подробным введением к изложению главы Результаты и обсуждение. В первом подразделе освещены современные представления о малигнизации клеток и общие закономерности канцерогенеза, во втором – о механизмах регуляции и путях активации системы апоптоза, а также роли исследованных генов в процессе апоптоза. Приведены литературные данные о роли метилирования ДНК и микроРНК в онкогенезе. Эта глава читается с особенным интересом. Представляется полезным публикация этой главы обзора, сведения в которой весьма новы и актуальны. В заключительной части обзора литературы проанализированы основные достижения, недостатки и противоречия в вопросах, связанных с совершенствованием методов ранней диагностики и прогнозирования лечения онкологических заболеваний. Обоснованы актуальность проблемы и

поставленных автором задач для ее решения. Обзор написан хорошим литературным языком на основании изучения большого объема литературы.

В главе Материалы и методы описаны критерии отбора опухолевых образцов, приведена подробная характеристика биологического материала, использованного в работе, и методов исследования. Группы БКГ и генов миРНК для исследования были отобраны автором по результатам биоинформатического анализа баз данных и литературных источников, указывающих на связь этих апоптоз-ассоциированных генов с возникновением и/или прогрессией эпителиальных опухолей молочной железы и яичников. Обращает внимание классическая, но тщательно доработанная методика выделения препаратов ДНК и РНК, подлежащих длительному хранению, а также тщательный подбор разнообразных контролей для выполнения экспериментальной части работы (контрольных образцов ДНК и/или РНК из гистологически нормальных тканей пациентов, и контрольных образцов ДНК из тканей онкологически здоровых индивидуумов в анамнезе). Работа выполнена на представительной выборке клинического материала (165 человек). В отдельной главе даны использованные методы статистического анализа, соответствующие современному уровню. Таким образом, работа выполнена на высоком методическом уровне.

В главе «Результаты и обсуждение» автором приведены актуальные и достоверные научные результаты. Филипповой Е.А. показано гиперметилирование промоторных CpG-островков БКГ: *BCL2*, *DAPK1*, *BAX*, вовлеченных в апоптоз, и 9 генов миРНК: *MIR-124-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-193a*, *-203a* при РЯ. При РМЖ определены гены с гиперметилированием: *RASSF1*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, *APAF1*, *MIR-124a-1/3*, *-125b1*, *-127*, *-129-2*, *-148a*, *-193a*, *-375*, а также показано деметилирование гена *BCL2*. Выявлена статистически значимая корреляция между aberrантным метилированием 4-х генов миРНК (*MIR-125b1*, *-129-2*, *-148a*, *-375*) и изменением уровня экспрессии этих генов, что указывает на роль метилирования в нарушении регуляции экспрессии генов миРНК в патогенезе РМЖ, а также между aberrантным метилированием и уровнем экспрессии генов *DAPK1*, *BCL2*, *MIR-124-1/3*, *-125b-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-375* при РЯ. Построены опухоль-специфичные профили экспрессии для 7 исследованных миРНК, вовлеченных в прогрессию РМЖ и РЯ. Данные об изменении уровня экспрессии миРНК на ранних или поздних стадиях прогрессии опухоли важны для отбора маркеров ранней диагностики или прогноза онкологического заболевания.

Одним из наиболее интересных результатов, полученных и обсуждаемых автором, являются данные о взаимосвязи различных пар миРНК-мРНК ген-мишень, потенциально связанных с регуляцией апоптоза при РМЖ. На основе анализа уровней экспрессии группы БКГ, связанных с апоптозом, и предсказанных регуляторных миРНК в опухолях молочной железы определены три прямо или опосредованно, патологически взаимодействующие пары миРНК – мРНК (*miR-375* – *RASSF1*, *miR-124-3p* – *BCL2*, *miR-127-5p* – *DAPK1*).

Автором показана роль метилирования, миРНК и опосредованно метилирования генов миРНК в регуляции группы БКГ, ассоциированных с апоптозом, при РМЖ и РЯ, что может найти применение для разработки новых подходов к лечению этих социально значимых видов рака.

На основании полученных данных об aberrантном метилировании БКГ и генов миРНК Филипповой Е.А.-предложены потенциальные системы маркеров для диагностирования РЯ и РМЖ в том числе на I-II клинических стадиях, а также потенциальные системы маркеров для прогнозирования метастазирования рака яичников.

Раздел, в котором автор обсуждает полученные результаты, включает в себя суммирование полученных данных с их подробным анализом и сопоставлением результатов с исследованиями, отраженными в мировой литературе. Сформулированные автором выводы целиком вытекают из полученных результатов, соответствуют поставленным цели и задачам исследования. Полученные результаты представляют интерес для патофизиологов и для клиницистов.

Таким образом, в диссертационной работе Филипповой Е.А. выявлены достаточно четкие закономерности в изменении уровня экспрессии группы генов в опухолях, показан опухоль специфический характер этих изменений и определена роль эпигенетических механизмов в регуляции этих генов. Эти результаты имеют несомненное значение для развития современных представлений о путях патогенеза в неоплазиях, для понимания роли каждого из исследованных генов и миРНК в онкогенезе и механизмах, вовлеченных в дерегуляцию генов в злокачественных опухолях.

Основные результаты диссертационного исследования отражены в публикациях. По материалам 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 и патент на изобретение №2666911. Автореферат полностью соответствует основным положениям диссертации.

При оценке работы хотелось бы отметить, что она интересна не только с научной точки зрения, но и имеет перспективное применение в практике.

Замечаний принципиального характера по работе нет.

**Заключение.** Работа Филипповой Елены Александровны «Аномальная экспрессия и aberrантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной железы и яичников» отражает актуальную проблему патофизиологии – выявление и описание роли метилирования и микроРНК в процессах онкогенеза в тканях молочной железы и яичников. По научной значимости, объему и уровню исследований диссертация полностью соответствует критериям, которым должна отвечать работа на соискание степени кандидата медицинских наук и является законченным научно-квалификационным исследованием.

Представленная работа 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 заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология.

**Официальный оппонент:**

Ведущий научный сотрудник отдела лабораторной генетики  
федерального государственного бюджетного учреждения  
«Государственный научный центр колопроктологии имени  
А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
доктор медицинских наук

А.С. Цуканов

**Подпись А.С. Цуканова заверяю**

Ученый секретарь ФГБУ «ГНЦК  
им. А.Н. Рыжих» Минздрава России,  
доктор медицинских наук



А.Ю. Титов

« 14 » 02 2020г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации  
123423, Москва, ул. Саляма Адиля, д. 2, телефон: +7 (499) 199-15-67, e.mail:  
info@gnck.ru сайт: <http://new.gnck.ru/>