ОТЗЫВ

официального оппонента о научно-практической значимости диссертационной работы Губенко Марины Сергеевны на тему: «Роль эпигенетических механизмов регуляции группы опухоль-ассоциированных генов в патогенезе немелкоклеточного рака легкого», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 03.03.03 – Патологическая физиология

Актуальность темы исследования

По актуальной статистике в России и мире в целом рак легкого характеризуется самым высоким количеством летальных исходов ежегодно как среди мужчин, так и среди женщин. При выявлении рака легкого более 80% случаев приходятся на немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), что несомненно обуславливает актуальность исследований патогенеза и выявления новых молекулярных маркеров НМРЛ.

Наряду с генетическими изменениями в процесс малигнизации тканей вовлечены аберрантные изменения эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, к числу которых относятся исследуемые в работе Губенко Марины Сергеевны метилирование ДНК и микроРНК. Важно, что экспрессия генов микроРНК в свою очередь также подвержена регуляции посредством метилирования CpG-островков в промоторных участках этих генов.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В диссертации представлены результаты, обладающие научной новизной, теоретической и практической значимостью:

- Показано повышенное метилирование генов *MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR1258* и *MIR339*, а также генов *BIM* и *BAX* в опухолях НМРЛ по сравнению с парной гистологически нормальной тканью легкого.
- Выявлены значимые изменения метилирования ряда генов с учётом клинико-морфологических особенностей опухоли.

- Установлены статистически значимые зависимости между изменениями уровня экспрессии и статуса метилирования гена BAX в опухолях пациентов с НМРЛ.
- На оставании статистического анализа экспрессии мРНК и микроРНК в образцах опухолей пациентов НМРЛ определены три потенциально взаимодействующие пары микроРНК - мРНК, связанные с нарушением регуляции генов апоптоза (miR-127-5p - DAPK, miR-375 - RASSF1 и miR-124-3p - BCL2).
- Определены новые маркеры и их комбинации, имеющие высокий диагностический и прогностический потенциал для больных немелкоклеточным раком легкого (AUC>0.960).

Выявленные в работе наборы аберрантно метилированные гены микроРНК могут быть использованы для диагностики и прогнозирования НМРЛ.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Полученных в работе результаты, их обоснованность и достоверность сомнений не вызывает. Результаты диссертации опубликованы в 4 экспериментальных научных статьях, опубликованных в русскоязычных журналах ВАК; апробированы на многочисленных российских конференциях.

Крастая характеристика основного содержания диссертации

Диссертация Губенко М.С. имеет классическое строение и состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», раздела «Результаты и обсуждение», выводов; содержит приложение и список литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования; формулирует цель и основные задачи работы; характеризует степень новизны, теоретической и практической значимости полученных результатов; формулирует положения выносимые на защиту.

Диссертация содержит интересный обзор литературы, в котором автор описывает особенности генов микроРНК и белоккодирующих генов (БКГ), выбранных для исследования. Далее следует раздел «Материалы и методы».

В разделе «Результаты и обсуждение» в подразделе 3.1 автор подробно описывает результаты исследований взаимосвязи уровня метилирования выбранных генов с развитием и прогрессией НМРЛ и его гистологических подтипов – ПРЛ и АД. Так, было выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *APAF1, BAX, BIM* и *DAPK1*, на более тяжелых III-IV стадиях НМРЛ по сравнению с более ранними стадиями (I-II). Также статистически значимо высокий уровень метилирования генов *APAF1, BIM, DAPK1* был связан с увеличением размера опухоли (T1/T2 против T3/T4), а для генов APAF1, BAX, DAPK1 – с наличием лимфогенного метастазирования (N0 против N1). Также автор делает вывод о значимости уровня метилирования 10-ти генов миРНК (*MIR124-1/2/3, MIR125B-1, MIR127, MIR129-2, MIR137, MIR375, MIR1258, MIR339*) в исследуемых патологиях.

В подразделе 3.2 автор описывает результаты исследований о взаимосвязи аномальной экспрессии белоккодирующих генов и миРНК с развитием НМРЛ и его гистологических подтипов. В том числе проведен анализ изменения уровня экспрессии 5-ти БКГ и 7 микроРНК в зависимости от клинико-морфологических параметров НМРЛ (клиническая стадия, степень дифференцировки, размер опухоли, лимфогенное метастазирование, метастазы в другие органы, статус курильщика). Среди БКГ только гена *BAX* было выявлено для статистически значимое снижение уровня экспрессии мРНК в образцах с более тяжелой (III+IV) стадией онкологического процесса и лимфогенным метастазированием. Среди исследуемых микроРНК только для miR-137 была выявлена статистически значимая корреляция снижение уровня экспрессии в опухолях большого размера (более 7 см).

В подразделе 3.3 представлены результаты исследования корреляции уровня метилирования 5-ти БКГ и 9-ти генов микроРНК с уровнем их экспрессии в образцах опухолей НМРЛ. Была показана значимая отрицательная корреляция между изменением уровня метилирования промоторных CpG-островков и уровнем экспрессии для четырех БКГ из пяти исследуемых (*APAF1,*

BAX, BCL2, DAPK1). Интересно, что ни для одного из исследуемых генов микроРНК статистически значимой корреляций между уровнем метилирования и уровнем экспрессии гена, обнаружено не было.

В подразделе 3.4 автор исследует возможность регуляции экспрессии исследуемых БКГ семью микроРНК (miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-137, miR-339-3p, miR-375), для которых эти БКГ могут быть потенциальными генами-мишенями. Полученные результаты позволяют предполагать возможность регуляции экспрессии генов *BCL2, BIM, DAPK1* с помощью микроРНК miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-339-3p, miR-375.

Подраздел 3.5 посвящен анализу возможности применения оценки уровня метилирование генов микроРНК в качестве маркер для диагностики и прогноза НМРЛ. В результате были сформированы 2 панели: 1) панель из трех маркеров: MIR125B-1, MIR1258 и MIR339 (Se = 92,7; Sp = 85,8; AUC = 0,967; p<10-5); 2) панель из четырех маркеров: MIR124-3, MIR125B-1, MIR137, и MIR1258, которая позволила повысить чувствительность и специфичность выше 90% (Se = 98,9; Sp = 94,5; AUC = 0,968; p=1x10-6), причем для достижения указанных параметров необходимо было обнаружение метилирования двух из предложенных генов.

В подразделе 3.6 автор обобщает полученные в работе результаты и анализирует их в контексте имеющихся в литературе данных.

Таким образом, представленные в диссертации результаты способствуют расширению представлений о роли метилирования ДНК в регуляции активности опухоль-ассоциированных БКГ. Полученные результаты демонстрируют взаимосвязь гиперметилирования промоторных районов БКГ и генов микроРНК с возникновением и прогрессированием НМРЛ и его гистологических подтипов, предлагают новые потенциальные биомаркеры для диагностики НМРЛ.

К работе возникли следующие замечания и вопросы:

1. Из текста диссертации не понятно, почему в подразделе 3.3 исследовалась корреляция уровня метилирования только 9-ти генов миРНК (из 10-ти исследуемых в диссертации) с уровнем их экспрессии в образцах опухолей НМРЛ.

2. Автору следовало обсудить обнаруженный в работе факт отсутствия значимой корреляций между уровнем метилирования и уровнем экспрессии генов микроРНК (ни для одного из исследуемых генов микроРНК такой корреляции выявлено не было).
3. Автору следовало подробнее описать методику проведения метил-специфичной ПЦР-РВ. Автор подробно приводит технические подробности (температура проведения реакций, объемы, концентрации), однако при описании самого принципа детекции ограничивается фразой «для МС-ПЦР-РВ были использованы праймеры, ранее описанные в литературе (Логинов В.И. и др., 2016; Брага Э.А. и др., 2019; Логинов В.И. и др., 2021)».

   В конечном итоге автор рассчитывает значение индекса метилирования (ИМ). Данный индекс рассчитывался по формуле ИМ = 100 × (число метилированных копий гена (M)/(число метилированных копий гена (M) + число неметилированных копий гена (U)). Интересным представляется вопрос, может ли иметь значение полнота метилирования промоторной области гена, а не только количество метилированных/неметилированных копий гена. Позволяет ли используемый автором метод оценить это? Могут ли различия в «полноте» метилирования промоторной области гена быть причиной отсутствия корреляции уровня метилирования с уровнем экспрессии генов миРНК?
4. В тексте диссертации в подразделе 3.6 автор пишет, что предложенная в работе панель из четырех микроРНК (MIR125B-1, MIR1258, MIR137, MIR124-3), может быть предложена не только как диагностическая панель, но и в качестве потенциальной системы для отслеживания эффективности лечения. Требуются пояснения на каких основаниях автор расширяет возможность применения данной панели генов для отслеживания эффективности лечения.
5. В разделе «Научная новизна работы» пункт: «Определены новые маркеры и их комбинации, имеющие высокий диагностический и прогностический потенциал для больных немелкоклеточнгым раком лёгкого (AUC≥0.960).» следовало сформулировать конкретнее, указав, конкретно какие маркеры

обнаружены. Также в этом разделе первый абзац – это в общем виде сформулированный абзац номер два (смысловой повтор).

6. Встречаются опечатки и несогласованные предложения, например:
   - стр. 6 автореферата «для больных немелкоклеточнгым раком»
   - стр. 7 автореферата «Выявлена связь молекулярных изменений с клинико-патофизиологическими и характеристиками образцов опухолей пациентов»
   - в третьем абзаце раздела «Научная новизна работы» в начале предложения речь идет про один ген BAX, однако в завершении автор пишет во множественном числе «…регуляции данных генов».
   - «Для генов *BIM*, *BAX* и *APAF1* показано статистически увеличение уровня метилирования в образцах НМРЛ.»

     и др.

Указанные выше вопросы и замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую высокую положительную оценку диссертационного исследования М.С. Губенко.

Общее заключение:

Диссертационная работа Марины Сергеевны Губенко, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.03 – Патологическая физиология, является законченной научно-квалификационной работой, соответствующей паспорту специальности 03.03.03 – «Патологическая физиология».

Диссертационная работа Марины Сергеевны Губенко «Роль эпигенетических механизмов регуляции группы опухоль-ассоциированных генов в патогенезе немелкоклеточного рака легкого», в частности ее актуальность, научная новизна, достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов, соответствуют критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней« (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно

заслуживает присвоения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.03.03 – Патологическая физиология.

Официальный оппонент:
декан Факультета биологии и
биотехнологии Федерального
государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Национальный
исследовательский университет
«Высшая школа экономики»,
профессор, д.б.н.,
член-корр. РАН А.Г. Тоневицкий
e-mail: atonevitsky@hse.ru
тел.: +79037241765
дата: 07.11.2023г.

Подпись заверяю
СПЕЦИАЛИСТ
ПО ПЕРСОНАЛУ
КИСИНМ.