

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Генеральный директор  
ФГБУ «НМИЦ радиологии»

Минздрава России

д.м.н., проф., академик РАН

Каприн А.Д.

«03» *А.Д. Каприн* 2023 года



## **ОТЗЫВ**

Ведущей организации федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Новиковой Инны Арнольдовны «Биологическая роль и прогностическая значимость клеточных и молекулярных характеристик рака ободочной кишки», представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Колоректальный рак (КРР) занимает третье место среди злокачественных новообразований в мире и вторую по распространенности причину смертности от рака независимо от пола. Курение, чрезмерное употребление алкоголя, высокое потребление красного и переработанного мяса, воспалительные заболевания кишечника, ожирение, сахарный диабет, семейный анамнез, возраст и пол считаются некоторыми факторами риска развития КРР.

Высокие показатели заболеваемости и смертности, наблюдаемые при раке толстой кишки, а также, высокий удельный вес новообразования, выявленного на III-IV стадиях заболевания, как в России, так и в мире, диктуют необходимость проведения исследований, направленных на поиск дополнительных маркеров опухолевой прогрессии и стратификации

пациентов на группы риска. Далеко не всегда биологическое поведение опухоли определяется с использованием традиционных факторов прогноза, таких как, TNM стадирование, гистопатологическая характеристика опухоли и степень ее дифференцировки. Не нашли должного применения в клинической практике и выявленные молекулярно-биологические подтипы рака толстой кишки - система идентификации подтипов KPP основана на транскриптомном и геномном анализе, что является сложно воспроизводимым в рутинной клинической практике.

На сегодняшний день, несмотря на успехи современной онкологии, метастазирование опухоли продолжает оставаться главной причиной смерти от рака. Не подлежит сомнению тот факт, что эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) играет ключевую роль в опухолевой прогрессии и метастазировании. Были идентифицированы и охарактеризованы опухолевые стволовые клетки (ОСК), в значительной степени ответственные за метастазирование, лекарственную устойчивость и рецидивирование заболевания после проведенной терапии. Значение циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в метастатическом каскаде также рассматривается и исследуется во всем мире в течение последних двадцати лет.

Появляется все больше свидетельств того, что прогрессирование опухоли обусловлено не только генетическими изменениями, присущими опухолевым клеткам, но и факторами микроокружения опухоли. Опухолевые клетки демонстрируют многообразие механизмов противодействия иммунной системы на всех этапах опухолевого роста. Нельзя исключать, что взаимосвязь между иммунной системой и опухолевыми клетками в первичной опухоли (локальный иммунитет) и периферической крови (системный иммунитет) является значимой для развития и распространения опухоли. Было показано, что иммунные клетки в опухолевом микроокружении модулируют прогрессирование рака и являются потенциальными терапевтическими мишенями. С другой стороны, микроРНК опухолевых клеток модулирует микроокружение опухоли,

изменяя молекулярный профиль соседних клеток, а также, играет ключевую роль в регуляции функции нормальных и опухолевых стволовых клеток посредством их взаимодействия с основными путями передачи сигналов, необходимыми для поддержания плюрипотентности стволовых клеток.

Неудовлетворительные результаты лечения, особенно распространенных опухолей, а также нередко наблюдающееся быстрое их прогрессирование, требуют персонализации терапии и заставляют искать не только новые средства лечения, но и глубже исследовать биологию опухоли, ее молекулярно-генетические характеристики и состояние микроокружения, от которых зависят пролиферация опухолевых клеток и их метастатический потенциал, что в конечном счете и обуславливает ее распространение.

Диссертационное исследование Новиковой И.А. посвящено комплексной оценке факторов системного и локального иммунитета при различном качественном и количественном содержании ОСК и ЦОК, изучению молекулярно-генетических характеристик опухоли, включая микроРНК, содержащиеся в опухоли и в ЦОК, а также их генов-мишеней, обуславливающих стимуляцию или подавление онкогенного потенциала опухолевых клеток, а также разработке новых подходов к оценке их влияния на прогноз течения КРР и выделению групп больных с наиболее неблагоприятным прогнозом течения заболевания. Актуальность проблем, поднятых в работе, не вызывает сомнения.

### **Научная новизна диссертационного исследования**

Результаты исследования обладают значительной степенью новизны.

Автором впервые было проведено комплексное многоуровневое исследование и получены новые данные о биологической роли и клинической значимости ЦОК и ОСК, о взаимовлиянии ЦОК и ОСК на факторы системного и локального иммунитета, исследованы профиль транскрипционной активности микро-РНК и их генов мишеней в опухолевой ткани толстой кишки, профиль транскрипционной активности микроРНК изолированных ЦОК, проведен биоинформационный анализ участия

выявленных микроРНК в регуляции ЭМП и стволовклеточного опухолевого потенциала. Выявленные новые данные послужили основой для разработки математических алгоритмов течения заболевания и риска развития неблагоприятных исходов заболевания, с учетом которых могут быть определены подходы к персонализированному лечению больных.

Автором впервые проведена количественная оценка ЦОК у больных раком ободочной кишки и установлены статистически значимые связи их с некоторыми клинико-морфологическими и генетическими факторами. Показано снижение кумулятивной выживаемости больных при увеличении уровня ЦОК. Проанализированные показатели системного иммунитета при наличии ЦОК демонстрировали угнетение противоопухолевых свойств клеток врожденного и адаптивного иммунитета, а также цитокиновый дисбаланс. Риск развития летального исхода увеличивался при повышении содержания натуральных киллеров CD16dim56bright и IL-6.

Впервые показана связь ОСК в ткани опухоли с некоторыми клинико-морфологическими характеристиками и уровнем ЦОК. Повышение в опухолевой ткани экспрессии CD44, CD133 и ZEB1 сопровождалось увеличением риска развития летального исхода, а совместный анализ уровня экспрессии CD44 и количества ЦОК взаимно усиливал информативность прогноза риска развития летального исхода.

Впервые продемонстрировано формирование иммуносупрессивного и ростостимулирующего иммунологического микроокружения на локальном уровне в зависимости от количественных и качественных характеристик ОСК. Кроме того, автором отмечено повышение риска развития летального исхода при снижении экспрессии опухолевыми клетками ГКГС 1 типа и увеличении доли PD-1 лимфоцитов.

Показано нарастание количества микроРНК с измененной экспрессией при нарастании стадии заболевания. Наибольшее влияние на развитие летального исхода выявлено для miR-126-5p, miR-25-3p и miR-21-5p. Выявлены однонаправленные изменения экспрессии микроРНК в ЦОК и в

опухолевой ткани. Наибольшее влияние на развитие летального исхода оказывали падение экспрессионной активности гена GSK3B и повышение экспрессии CD44 и MYC.

Разработанные автором математические прогностические алгоритмы, с учетом показателей экспрессии микроРНК, рецепторов ОСК и ЭМП, системного и локального иммунитета, уровня ЦОК, позволяют оценивать факторы риска летального исхода и метастазирования у больных раком ободочной кишки II-IV стадий в течение пяти лет после операции.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Работа является комплексным многоуровневым исследованием, в ходе которого поставлен целый ряд задач фундаментального и прикладного характера и получены новые для изучаемой области знаний результаты. Выполненное на различных уровнях исследование вносит дополнительные знания, касающиеся актуальной проблемы онкологии – концепции метастазирования.

Так, показана биологическая роль ОСК и ЦОК, способных воспроизводить признаки первичной опухоли, в формировании локальных и системных изменений их иммунологического микроокружения. На локальном уровне, в зависимости от различных фенотипических характеристик ОСК происходят изменения факторов локального иммунитета, где наибольшая иммуносупрессия, в виде снижения уровня CD4+, NK-клеток, HLA-ABC+ опухолевых клеток и повышения уровня Tregs и PD-1+ лимфоцитов отмечена при наличии ОСК, коэкспрессирующих CD44+CD133+. На системном уровне наличие ЦОК у больных раком ободочной кишки вне зависимости от стадии опухоли сопровождается изменениями, характеризующими угнетение противоопухолевых свойств, в NK-клеточном и фагоцитарном звеньях врожденного иммунитета и T-лимфоцитарном звене адаптивного иммунитета, а также цитокиновый дисбаланс.

Исследование, направленное на комплексный анализ профиля транскрипционной активности микроРНК и их генов-мишеней в опухоли, выявило их участие и роль в активации сигнальных путей эпителиально-мезенхимального перехода и стволовклеточного опухолевого потенциала. Установлена связь выживаемости больных с гиперэкспрессией 11 и снижением экспрессии 3 генов. Показано, что для дифференциальной диагностики больных с наличием регионарного и отдаленного метастазирования может быть использовано определения уровня экспрессии hsa-miR-26a-5p в ЦОК.

На основе фундаментальных данных, полученных в ходе выполнения работы, были разработаны математические алгоритмы, подтверждающие практическую значимость работы. Автором разработаны прогностические алгоритмы и способы прогнозирования риска летального исхода и метастазирования рака ободочной кишки (патенты RU 2613142 и RU 2772207), а также, срока развития отдаленного метастазирования (решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2022108351/14 от 30.03.2022 г.).

#### **Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций**

Основное содержание диссертационной работы изложено в 48 печатных работах, из них 12 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, из которых 5 – в изданиях международной реферативной базы данных и системы цитирования, получено 2 патента на изобретение Российской Федерации.

Достоверность полученных результатов, сформулированных выводов и научных положений определяется достаточным количеством материала о результатах исследования 351 больного раком ободочной кишки II-IV стадий и длительном периоде наблюдения за ними. Объективность научных данных основана на использовании современных иммунологических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических методах исследования

опухоли и изолированных ЦОК (проточная цитометрия, иммуноферментный анализ, детекция и сепарация ЦОК с использованием системы Veridex CellSearch, иммуногистохимический метод, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, биоинформационный анализ данных с использованием баз данных miRBase/mirGeneDB, miRecords, miRTarBase, TarBase, BioCarta и Gene Ontology).

Для статистического анализа полученных данных были использованы методы многомерной статистической обработки с применением современных компьютерных программ. Анализ бессобытийной выживаемости пациентов проводили с использованием метода Каплана-Майера. Для прогноза неблагоприятных событий использовали метод логистической регрессии и ROC анализа. С помощью метода регрессионного анализа Кокса была проведена оценка влияния изученных параметров на риск развития неблагоприятного события.

Решение запланированных задач дало возможность разработать математические модели прогнозирования риска развития летального исхода и риска метастазирования, а также, сроков развития последнего. Практические рекомендации полностью обоснованы и подтверждены результатами, полученными в ходе исследования.

#### **Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом**

Научно–исследовательская работа изложена на 346 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 615 источников, в том числе 47 отечественных и 568 зарубежных. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 97 таблицами, 5 клиническими примерами.

Введение содержит информацию об актуальности и необходимости проведения данного исследования. Цель сформулирована четко, конкретизирована в поставленных задачах. Научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, отражают суть работы.

Обзор литературы посвящен современным представлениям о молекулярно-биологических и иммунологических характеристиках КРР. Автором показано, что вопросы, касающиеся взаимодействия между опухолевыми и иммунокомпетентными клетками, находятся на острие актуальности в связи с поиском новых мишеней и контрольных точек для иммунотерапии рака толстой кишки. Автор подробно останавливается на внутриопухолевой гетерогенности, детально характеризует иммунофенотип и свойства ОСК, их роль в ЭМП, рассматривает вопросы, связанные с молекулярно-генетическими характеристиками, механизмами прогрессирования опухоли и моделями метастазирования.

В главе 2 подробно приведена характеристика клинического материала и методов исследования и методы статистической обработки данных. Представлен дизайн исследования, обозначены критерии включения и исключения пациентов.

В главе 3 представлены данные о частоте выявления ЦОК у больных раком ободочной кишки и их связь со стадией заболевания, уровнем инвазии опухоли, статусом лимфатических узлов, метастатическим поражением печени, степенью дифференцировки опухоли, лимфоваскулярной инвазией и лимфоцитарной инфильтрацией опухоли. При этом не установлено статистически значимой связи наличия или отсутствия уровней ЦОК с полом и возрастом больных, с локализацией опухоли и наличием периневральной инвазии.

В главе 4 проанализированы показатели системного иммунитета при наличии и отсутствии ЦОК. Выявлено, что наличие ЦОК у больных раком ободочной кишки вне зависимости от стадии характеризуется угнетением его противоопухолевых свойств в виде снижения уровня НК-клеток за счет их субпопуляции, обеспечивающей антителозависимую цитотоксичность (CD16<sup>+</sup>56dim), и увеличением субпопуляции НКТ-клеток и CD16dim56bright, а также тенденцией к снижению перфорин-содержащих клеток. При локализованных стадиях наличие ЦОК сопровождается стимуляцией

фагоцитоза, при генерализованной – его угнетением. Показано, что повышение уровня ЦОК вне зависимости от стадии характеризуется угнетением Т-хелперного звена и возрастанием Т-цитотоксических клеток, по мнению автора, функционально дефектных. Автором выявлен цитокиновый дисбаланс, наиболее выраженный при генерализованном опухолевом процессе.

В главе 5 представлены результаты анализа экспрессии маркеров ОСК и ЭМП в ткани опухоли ободочной кишки в зависимости от клинико-морфологических показателей опухоли и при различном уровне ЦОК. Все исследованные маркеры ОСК были статистически значимо связаны со стадией заболевания, наличием отдаленных метастазов, с глубиной инвазии опухоли и степенью выраженности ее лимфоцитарной инфильтрации. Кроме того, показано сопряжение экспрессии уровня ЦОК и маркеров ОСК и ЭМП.

В глава 6 приведены результаты анализа показателей локального микроокружения опухоли и характеристик опухолевых клеток. Наиболее выраженные изменения в опухолевых клетках и их микроокружении выявлены при коэкспрессии маркеров ОСК CD44+ и CD133+, заключающиеся в повышении доли CD3+, CD8+, Tregs, и PD-1 - лимфоцитов при снижении CD4+, CD56+ и PD-L1 - лимфоцитов. При этом экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках возрастала, а экспрессия ГКГС – снижалась.

В главе 7 автором проанализирован профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолях и в циркулирующих опухолевых клетках, а также их генов-мишеней у больных раком ободочной кишки II-IV стадий. Наибольшее отклонение экспрессии микроРНК от показателей нормальной ткани отмечено в группе больных IV стадии. Сравнение профиля экспрессии микроРНК в опухолевой ткани и ЦОК выявило как общие черты, так и различия, касающиеся экспрессии hsa-miR-26a-5p, которая в опухолях различных стадий снижена примерно до одинакового уровня, а в ЦОК значимо отличается при регионарном и отдаленном метастазировании. Биоинформационный анализ показал участие выявленного паттерна

микроРНК для сигнальных путей, определяющих эпителиально-мезенхимальный переход и сигнальной сети ОСК, считающихся основными в прогрессировании опухоли. Автором был также оценен профиль экспрессии генов, являющихся ключевыми участниками сигнальных путей ЭМП и ОСК при различных стадиях. Показано, что генерализация опухолевого процесса опосредуется через изменение транскрипционной активности 12 протоонкогенов и 2 онкосупрессоров.

Глава 8 посвящена оценке влияния ЦОК, ОСК, их молекулярно-генетических характеристик, системных и локальных иммунологических факторов на выживаемость больных раком ободочной кишки. Регрессионный анализ Кокса позволил выявить наиболее значимые показатели и объединить их в несколько прогностических алгоритмов. В разработанные прогностические алгоритмы включены данные об уровне ЦОК, ОСК, а также показатели их иммунного микроокружения и молекулярно-генетические характеристики, что свидетельствует об их тесной взаимосвязи для определения прогноза при раке ободочной кишки.

В Заключение подведен итог выполненных исследований и обобщены полученные данные. Подчеркнуты комплексный и многоуровневый характер работы, выполненной в русле трансляционной медицины, содержится тщательный анализ полученных результатов в сравнении с данными отечественных и зарубежных исследований. Выводы диссертации логически вытекают из результатов исследования и полностью соответствуют сформулированной цели и задачам. На основании полученных данных автором даны практические рекомендации. Приведенный обширный библиографический указатель достаточен, источники литературы совпадают с таковыми в тексте диссертации. Автореферат отражает основные положения диссертации, хорошо иллюстрирован.

**Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы**

Результаты и выводы диссертационной работы Новиковой Инны Арнольдовны могут быть использованы в практической деятельности учреждений, оказывающих помощь онкологическим больным.

Результаты диссертационного исследования внедрены в клиническую и научную практику отделения абдоминальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (акт внедрения от 12.04.2017г.) и лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (акт внедрения от 26.05.2022г.).

Фундаментальные теоретические положения используются в учебном процесс на кафедре онкологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, в образовательных программах обучения ординаторов и аспирантов на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

#### **Вопросы и замечания**

Принципиальные замечания по диссертационной работе отсутствуют.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Новиковой Инны Арнольдовны «Биологическая роль и прогностическая значимость клеточных и молекулярных характеристик рака ободочной кишки», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.6. - Онкология, лучевая терапия, является законченной научно-квалификационной работой, в котором решена актуальная научная проблема – разработана концепция метастазирования при раке ободочной кишки с учетом изменений, происходящих на молекулярно-генетическом, клеточном, тканевом, системном уровне и на уровне организма больных, прикладным выражением которой являются созданные прогностические алгоритмы риска летального исхода и отдаленного метастазирования рака ободочной кишки.

По своей актуальности, научной новизне, объему и уровню проведенных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Новиковой И.А. соответствует всем требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016, №1168 от 01.10.2018, №1539 от 11.09.2021), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а автор заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.6 – Онкология, лучевая терапия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании отделения клинической иммунологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №2 от 26 января 2023 г.).

Заведующий отделением клинической иммунологии

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала

ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России,

кандидат медицинских наук,

доктор биологических наук

Л.Ю. Гривцова

Подпись доктора биологических наук Гривцовой Л.Д. «заверяю»

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ радиологии»

Минздрава России



Жарова Е.П.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес организации: 249031, Российская Федерация, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, 4 Тел.: +7(484)399-31-30  
E-mail: mrrc@mrrc.obninsk.ru