**Денисов Евгений Владимирович**

**дата защиты 29. 11. 2022г.**

Тема диссертации: «Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы. Клинические и молекулярно-генетические особенности» по специальности 3.1.6 – онкология, лучевая терапия, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек – все по специальности 3.1.6 – онкология, лучевая терапия, участвовавших в заседании из 28 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против - нет, недействительных бюллетеней – нет





В 2014 году принят по внешнему совместительству на должность старшего научного сотрудника в лабораторию трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины Томского государственного университета. В 2015 году переведён на должность доцента кафедры органической химии, а в 2022 году на должность доцента кафедры природных соединений, фармацевтической и медицинской химии Томского государственного университета.

С 2019 года являлся ведущим научным сотрудником, а с 2022 года заведующим лабораторией биологии опухолевой прогрессии НИИ онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»).

Диссертация выполнена в НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН» в лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, и отделении общей и молекулярной патологии.

Научные консультанты:

- доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН» Чердынцева Надежда Викторовна;

- доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН» Перельмутер Владимир Михайлович.

Официальные оппоненты:

- Любченко Людмила Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной генетики и клеточных технологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва);

- Барлев Николай Анатольевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук (г. Санкт-Петербург);

- Кирсанов Кирилл Игоревич, доктор биологических наук,заведующий лабораторией канцерогенных веществ федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва).

Официальные оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организацияФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва), в своем положительном отзыве, подписанном доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией медицинской генетики Немцовой Мариной Вячеславовной указала, что диссертационная работа Денисова Евгения Владимировича «Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы. Клинические и молекулярно-генетические особенности», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия, является законченным самостоятельным исследованием, направленным решение на актуальной научной проблемы онкологии – идентификацию факторов, вовлечённых в формирование внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и оценку её вклада в эффективность лечения и риск прогрессирования данного заболевания. По объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» Постановления Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции от 30.07.2014 г. № 723, 21.04.2016 г. № 335, 02.08.2016 г. № 748, 29.05.2017 г. № 650, 28.08.2017 г. № 1024, 26.05.2020 № 751, 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6 – онкология, лучевая терапия.

Соискатель имеет 247 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 63 работы, из них 6 статей в рецензируемых научных изданиях (ВАК) и 12 статей в иностранных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus. Получено 2 патента на изобретение РФ: №2627649 от 09.08.2017 «Способ прогнозирования гематогенного метастазирования при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы у пациенток с хорошим ответом на неоадъювантную химиотерапию», бюл. №22, 09.08.2017 и №2623150 от 22.06.2017 «Способ прогнозирования гематогенного метастазирования при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы у пациенток с плохим ответом на неоадъювантную химиотерапию», бюл. №18, 22.06.2017 и 1 свидетельство о регистрации базы данных.

Основные работы:

1. Zavyalova M.V. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis / M.V. Zavyalova, V.M. Perelmuter, S.V. Vtorushin, E.V. Denisov, N.V. Litvyakov, E.M. Slonimskaya, N.V. Cherdyntseva // Diagnostic Cytopathology. – 2013. – Vol. 41, № 3. – P. 279-282. Авторский вклад 60%. *В данной работе представлено описание различных морфологических структур, их микрофотографии и ассоциация альвеолярных структур с высокой частотой лимфогенного метастазирования рака молочной железы.*
2. Zavyalova M.V. Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified / M.V. Zavyalova, E.V. Denisov, L.A. Tashireva, T.S. Gerashchenko, N.V. Litviakov, N.A. Skryabin, S.V. Vtorushin, N.S. Telegina, E.M. Slonimskaya, N.V. Cherdyntseva, V.M. Perelmuter // BioResearch Open Access. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 148-154. Авторский вклад 85%. *В данной работе представлены закономерности распределения различных типов морфологических структур в опухолях с различной степенью выраженности морфологической гетерогенности и результаты ассоциации количества типов структур и наличия альвеолярных структур с лимфогенным метастазированием рака молочной железы в зависимости от состояния репродуктивной функции пациенток.*
3. Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression // Scientific Reports. – 2014. – Vol. 4. – P. 1-7. Авторский вклад 85%. *Данная работа демонстрирует ассоциацию альвеолярных и трабекулярных структур с отсутствием ответа на неоадъювантную химиотерапию рака молочной железы и их экспрессионный профиль генов, обуславливающих лекарственную устойчивость.*
4. Denisov E.V., Geraschenko T.S., Zavyalova M.V., Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Kaigorodova E.V., Slonimskaya E.M., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Invasive and drug resistant expression profile of different morphological structures of breast tumors // Neoplasma. – 2015. – Vol. 62, № 3. – P. 405-411. Авторский вклад 95%. *Данная работа демонстрирует отличия различных морфологических структур рака молочной железы в экспрессии генов клеточной адгезии, химиорезистентности и химиочувствительности.*
5. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Вторушин С.В., Паутова Д.Н., Крахмаль Н.В., Скрябин Н.А., Слепцов А.А., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Генетический портрет первичной лекарственной устойчивости различных морфологических структур рака молочной железы // Медицинская генетика. – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 21-24. Авторский вклад 95%. *В данной работе показана ассоциация альвеолярных и трабекулярных структур с эффективностью неоадъювантной химиотерапии, сопряженная с распространенностью опухолевого процесса в регионарные лимфоузлы и состоянием репродуктивной функции пациенток с раком молочной железы, а также экспрессия специфических генов химиорезистентности в различных морфологических структурах.*
6. Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Крахмаль Н.В., Паутова Д.Н., Литвяков Н.В., Вторушин С.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии // Acta Naturae – 2017. – Т. 9, № 1 (32). – С. 60-72. Авторский вклад 80%. *Данная работа демонстрирует ассоциацию внутриопухолевой морфологической гетерогенности с лимфогенным и гематогенным метастазированием рака молочной железы, эффективностью неоадъювантной химиотерапии и параметрами безметастатической выживаемости больных, а также особенности экспрессии генов эпителиально-мезенхимального перехода в различных морфологических структурах.*
7. Tashireva L.A., Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Pautova D.N., Buldakov M.A., Zavyalova M.V., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Intratumoral heterogeneity of macrophages and fibroblasts in breast cancer is associated with the morphological diversity of tumor cells and contributes to lymph node metastasis // Immunobiology. – 2017. – Vol. 222. – P. 631-640. Авторский вклад 85%. *В данной работе отражены особенности распределения различных популяций макрофагов и фибробластов в микроокружении различных морфологических структур и их профиль экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию иммуно-воспалительных реакций.*
8. Denisov E.V., Skryabin N.A., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Wilhelm J., Buldakov M.A., Sleptcov A.A., Lebedev I.N., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44+CD24- stemness // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – P. 61163-61180. Авторский вклад 85%. *В данной работе показана пространственная организация, цитогенетический и транскриптомный профиль, включая выраженность сигнальных путей, в т.ч. связанных с клеточной миграцией и инвазией, и экспрессию генов эпителиально-мезенхимальной пластичности, и особенности распределения опухолевых стволовых клеток в различных морфологических структурах.*
9. Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Novikov N.M., Tashireva L.A., Kaigorodova E.V., Savelieva O.E., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Different morphological structures of breast tumors demonstrate individual drug resistance gene expression profiles // Experimental Oncology. – 2018. – Vol. 40, № 3. – P. 228-234. Авторский вклад 95%. *Данная работа демонстрирует особенности экспрессии генов, вовлеченных в различные механизмы лекарственной резистентности, в морфологических структурах рака молочной железы.*
10. Gerashchenko T.S., Zolotaryova S.Y., Kiselev A.M., Tashireva L.A., Novikov N.M., Krakhmal N.V., Cherdyntseva N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Denisov E.V. The activity of KIF14, Mieap, and EZR in a new type of the invasive component, torpedo-like structures, predetermines the metastatic potential of breast cancer // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – P. 1-17. Авторский вклад 90%. *Данная работа демонстрирует идентификацию генов, ассоциированных с клеточной миграцией и инвазией, на основе биоинформатического анализа транскриптомных профилей различных морфологических структур рака молочной железы и валидацию прогностической значимости их белковой экспрессии в торпедоподобных структурах - новом типе инвазивного компонента опухолевой ткани молочной железы.*

Материалов или отдельных результатов, используемых в диссертации без ссылок на авторов и (или) источников заимствования, нет. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, отсутствуют.

На автореферат поступило 5 отзывов от:

*- доктора медицинских наук,* профессора, заслуженного деятеля науки РФ Кононова Алексея Владимировича, заведующего кафедрой патологической анатомии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

- доктора биологических наук Рыковой Елены Юрьевны, ведущего научного сотрудника федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»;

- *доктора медицинских наук,* профессора Рукши Татьяны Геннадьевны, заведующего кафедрой патологической физиологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации;

- *доктора медицинских наук,* профессора, член-корреспондента РАН Симбирцева Андрея Семёновича, научного руководителя федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно‑исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства;

- доктора биологических наук Глушанковой Наталии Александровны, заведующей лабораторией механизмов канцерогенеза Научно-исследовательского института канцерогенеза федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Все отзывы положительные, не содержат замечаний и вопросов.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что они являются ведущими специалистами по теме диссертационного исследования и дали свое согласие, а ведущей организации – тем, что она является ведущей научной организацией в области онкологии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- **получены** объективные данные о том, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы не связана с хромосомными нарушениями, а морфологические структуры представляют собой транскрипционно-обособленные популяции клеток, отличающиеся друг от друга экспрессией генов эпителиального и мезенхимального фенотипов, выраженностью сигнальных путей опухолевой инвазии и долей опухолевых стволовых клеток;

- **продемонстрировано**, что различные морфологические структуры рака молочной железы характеризуются специфическим транскрипционным потенциалом регуляции иммунно-воспалительных реакций и индивидуальными особенностями микроокружения;

- **установлено**, что альвеолярные и трабекулярные структуры ассоциированы с эффективностью неоадъювантной химиотерапии и гематогенным метастазированием у больных раком молочной железы: ассоциация альвеолярных структур с гематогенным метастазированием характерна только для больных с отсутствием ответа на неоадъювантную химиотерапию, а трабекулярных структур – для пациентов с химиочувствительными опухолями;

- **обнаружен** новый тип инвазивного компонента опухолевой ткани молочной железы, получивший название “торпедоподобные” структуры;

- **выявлены** белки, экспрессия которых на концах торпедоподобных структур ассоциирована с гематогенным метастазированием и безметастатической выживаемостью больных раком молочной железы;

- **доказана** эффективность использования внутриопухолевой морфологической гетерогенности в качестве модели для изучения клеточных и молекулярных особенностей инвазии и метастазирования рака молочной железы.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

**- представлены** убедительные данные о клеточных и молекулярных факторах, ассоциированных с развитием внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и её вкладом в опухолевую прогрессию и эффективность химиотерапии. Формирование различных морфологических структур не связано с хромосомными аберрациями, а ассоциировано с экспрессией генов эпителиально-мезенхимального перехода, наличием опухолевых стволовых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов и фибробластов. Различия в степени стволовости и эпителиальных и мезенхимальных характеристиках, а также в экспрессии генов химиорезистентности, вероятно, являются причиной дифференциального вклада морфологических структур в лимфогенное и отдаленное метастазирование рака молочной железы и эффективность неоадъювантной химиотерапии.

Значение полученных результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

**- показана** прогностическая значимость оценки внутриопухолевой морфологической гетерогенности для определения вероятности гематогенного метастазирования рака молочной железы;

**- показана** связь внутриопухолевой морфологической гетерогенности с эффективностью неоадъювантной химиотерапии больных раком молочной железы;

**- доказана** информативность внутриопухолевой морфологической гетерогенности как модели для идентификации новых прогностических маркеров рака молочной железы.

Полученные соискателем результаты исследования внедрены и используются в научно-исследовательской и практической работе НИИ онкологии Томского НИМЦ, в частности в лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, лаборатории биологии опухолевой прогрессии, отделении общей и молекулярной патологии и отделении общей онкологии.

Достоверность полеченных результатов исследования обеспечивается репрезентативным объемом изученной группы, включающей 700 больных раком молочной железы, достаточным количеством исследованного биологического материала, использованием классических гистологических и иммуногистохимических и современных иммунофлюоресцентных и молекулярно-генетических методов и различных подходов биоинформатического и статистического анализа данных. Все полученные выводы и положения, выносимые на защиту, являются обоснованными и логично вытекают из материалов проведенного научного исследования, а также адекватны поставленным задачам в диссертационной работе.

Личный вкладавтора заключается в определении идеи, цели, задач и дизайна работы. Автором самостоятельно изучена литература по тематике исследования (22 отечественные и 336 зарубежных работы). Самостоятельно сформированы исследуемые группы больных раком молочной железы, выполнена лазерная микродиссекция различных морфологических структур из срезов опухолевой ткани молочной железы, выделены из части микродиссектированного материала образцы РНК и принято участие в постановке микроматричного экспрессионного анализа. Автором в составе исследовательского коллектива разработаны протоколы совмещения полногеномной амплификации микродиссектированных образцов и микроматричной сравнительной геномной гибридизации и выполнены соответствующие эксперименты и иммуноокрашивания срезов опухолевой ткани молочной железы, минимизирующего деградацию РНК, и выполнена лазерная микродиссекция части образцов опухолевых клеток, позитивных и негативных по экспрессии белков KIF14, MIEAP и EZR. Автором самостоятельно подобран протокол подготовки кДНК-библиотек из образцов РНК, полученных из микродиссектированного материала иммуноокрашенных срезов ткани опухоли молочной железы, и выполнены запуски РНК-секвенирования на приборе NextSeq500. Самостоятельно проведена статистическая обработка данных исследования, анализ и обсуждение полученных результатов и подготовлен иллюстративный материал.

На заседании 29.11.2022 диссертационный совет пришел к выводу, что в диссертационной работе Денисова Евгения Владимировича на тему «Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы. Клинические и молекулярно-генетические особенности» по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия, решена важная актуальная научная проблема фундаментальной и клинической онкологии – понимание механизмов формирования внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и её вклада в эффективность неоадъювантной химиотерапии и прогрессирование данного заболевания. Полученные автором результаты открывают перспективы дальнейшего изучения внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы как модели для идентификации факторов, вовлеченных в регуляцию миграции, инвазии и метастазирования опухолевых клеток, и поиска новых прогностических и предиктивных маркеров и терапевтических мишеней. В практическом плане полученные результаты могут быть использованы для прогнозирования вероятности гематогенного метастазирования рака молочной железы и персонализации противоопухолевого лечения на основе анализа внутриопухолевой морфологической гетерогенности и учёта индивидуальных особенностей химиорезистентности различных морфологических структур. Диссертационный совет принял решение присудить Денисову Евгению Владимировичу ученую степень доктора биологических наук по специальности: 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве – 19 человек, из них докторов наук по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия – 19, участвовавших в заседании из 28 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор,

член-корреспондент РАН Беляев Алексей Михайлович

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук Филатова Лариса Валентиновна

29.11.2022