

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Денисова Евгения Владимировича
на тему «Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной
железы. Клинические и молекулярно-генетические особенности»,
представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по
специальности: 3.1.6 – онкология, лучевая терапия

Актуальность темы диссертационного исследования

Рак молочной железы является наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием и основной причиной смертности женского населения в структуре онкологических заболеваний. Хотя ранняя диагностика и использование различных таргетных препаратов значительно улучшили клинический исход заболевания, 5-ти летняя выживаемость женщин с метастатическим раком молочной железы не превышает 30%.

Одной из самых сложных проблем в лечении рака молочной железы является значительная меж- и внутриопухолевая гетерогенность, связанная с наличием биологически различных популяций опухолевых клеток в пределах опухоли. Гетерогенность опухолевых клеток, как правило, является результатом селективного давления со стороны опухолевого микроокружения или терапии и обуславливает различное клиническое поведение опухоли и эффективность лечения. Гетерогенность наблюдается также и на уровне клеток опухолевого микроокружения, которые, в свою очередь, могут быть представлены различными субпопуляциями или находиться в специфических функциональных состояниях. Такое разнообразие опухолевого, иммунного и стромального компонента в значительной степени влияет на клиническое течение рака молочной железы и определяет исход заболевания. Ситуация усложняется также тем фактом, что метастазы и рецидивы рака молочной железы также гетерогенны, и зачастую их клональный/популяционный состав отличается от первичной опухоли.

Потенциальным решением для повышения эффективности лечения больных раком молочной железы является обнаружение и уничтожение популяций опухолевых клеток, изначально устойчивых к воздействию терапии и обладающих высоким потенциалом к рецидивированию и/или метастазированию. Так, во многих работах показано, что клетки рака молочной железы, проходя эпителиально-мезенхимальный переход, приобретают ряд селективных преимуществ, включая признаки стволовости, способствующих формированию резистентности к терапии и успешному метастазированию.

Наиболее хорошо охарактеризована при раке молочной железы внутриопухолевая генетическая гетерогенность, при которой различные типы генных и хромосомных нарушений являются причиной разнообразия клонального и популяционного состава опухолей. Тем не менее, рак молочной железы характеризуется выраженной

гетерогенностью и на фенотипическом и морфологическом уровнях. Так, инвазивная карцинома неспецифического типа, встречающаяся в более чем 80% всех случаев рака молочной железы, демонстрирует крайне разнообразный инфильтративный компонент, представленный различными формированиями опухолевых клеток, причины и механизмы появления которых пока не известны. Ранее проведённые работы показали диагностическую и клиническую значимость внутриопухолевой морфологической гетерогенности, тем не менее, факторы, обуславливающие этот феномен, также не понятны. Однако данный факт может указывать на потенциальную привлекательность внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы как модели для поиска агрессивных популяций опухолевых клеток и обнаружения молекул, участвующих в возникновении терапевтической резистентности и прогрессии опухоли. Следовательно, исследования, посвящённые изучению внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы, весьма актуальны и востребованы.

Научная новизна

В диссертационной работе впервые проведена трёхмерная реконструкция различных морфологических структур рака молочной железы и подтверждены ранние предположения об их организации, сделанные на основе рутинных гистологических анализов.

Исследование генетического и транскрипционного компонента опухолевых клеток разных морфологических структур, содержания среди них опухолевых стволовых клеток и типирование иммунного и стромального состава микроокружения выполнено также впервые. Соответственно, полученные результаты новы и приоритетны.

В работе впервые использован подход для расшифровки молекулярных механизмов, участвующих в метастазировании на основе анализа транскриптома морфологических структур, в которых наблюдается активация сигнальных путей, определяющих клеточную подвижность и инвазивность. При валидации белковой экспрессии выбранных генов *KIF14*, *SPATA18* (MIEAP) и *EZR* обнаружен новый тип морфологических структур, показавших дифференциальную экспрессию данных белков. Более того, экспрессия *KIF14*, *SPATA18* (MIEAP) и *EZR* в торпедоподобных структурах оказалась связанной с частотой гематогенного метастазирования и безметастатической (metastatic-free) выживаемостью больных раком молочной железы.

Используя корреляционный анализ, были получены приоритетные результаты о связи гематогенного метастазирования и безметастатической выживаемости с

альвеолярными и трабекулярными структурами только у больных, получавших неoadъювантную химиотерапию, и в зависимости от её эффекта и о морфологических различиях опухолей с наличием и отсутствием ответа на химиотерапию, справедливых только для пациентов с сохранённой репродуктивной функцией.

В методическом плане в данной работе впервые предложен новый подход пространственной транскриптомики – секвенирование РНК клеток, полученных из иммунофлюоресцентно окрашенных срезов тканей с помощью лазерной микродиссекции. Данная технология стала возможной благодаря подбору режима иммуноокрашивания, предотвращающего разрушение РНК в клетках.

Значимость для науки и практики

Диссертационная работа предоставляет фундаментальные данные о взаимосвязи хромосомной нестабильности, стволовости, иммунного и стромального компонента опухолевого микроокружения, транскрипционных сигнатур эпителиально-мезенхимального перехода и химиорезистентности и морфологического разнообразия клеток рака молочной железы. Фактически, внутриопухолевая морфологическая гетерогенность может рассматриваться как модель для изучения пластичности опухолевых клеток и её связи с молекулярными и клеточными факторами. В этом плане полученные данные лишней раз указывают на то, что существуют различные состояния/этапы эпителиально-мезенхимального перехода и его тесная связь с феноменом стволовости, которые реализуются на морфологическом уровне и ассоциированы с популяционным составом макрофагов и фибробластов. Так, альвеолярные структуры с выраженным гибридным эпителиально-мезенхимальным состоянием содержат большее количество CD44+CD24- опухолевых стволовых клеток, тогда как для дискретных групп опухолевых клеток с мезенхимальным фенотипом характерно практически полное отсутствие стволовости. Интересно, что морфологическая пластичность опухолевых клеток в глобальном смысле не ассоциирована с хромосомными перестройками, при этом в одном случае обнаружена связь амплификации гена *PAX6* с дискретными группами опухолевых клеток.

Данные о различиях опухолей молочной железы с наличием и отсутствием ответа на неoadъювантную химиотерапию в степени выраженности внутриопухолевой морфологической гетерогенности и специфической экспрессии генов химиорезистентности в каждом типе морфологических структур могут быть положены в основу разработки решений для предсказания эффективности и молекулярно-ориентированного подбора химиопрепаратов.

Ассоциация альвеолярных, трабекулярных и торпедоподобных структур с гематогенным метастазированием рака молочной железы, установленная в диссертационной работе, может в дальнейшем использоваться для предсказания риска прогрессирования заболевания и коррекции противоопухолевого лечения с целью предотвращения формирования метастазов.

Альвеолярные и трабекулярные структуры, а также опухолевые клетки с дифференциальной экспрессией белков KIF14, MIEAP и EZR, ассоциированные с гематогенным метастазированием рака молочной железы, представляют собой агрессивные популяции опухолевых клеток, детальное изучение которых позволит обнаружить потенциальные терапевтические мишени для снижения риска прогрессирования данного заболевания.

Предложенная в данной работе технология совмещения иммуноокрашивания, лазерной микродиссекции и секвенирования РНК представляет собой доступный в экономическом и временном плане метод пространственной транскриптомики и позволяет анализировать полный транскриптом клеток интереса с сохранением их расположения в ткани. При этом использование мультиплексного иммуноокрашивания предоставляет возможность проводить корреляцию между экспрессией некодирующих РНК, генов и белков.

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы представляет собой привлекательную платформу для исследования механизмов и идентификации ключевых факторов пластичности опухолевых клеток в частности и обнаружения новых прогностических и терапевтических маркеров в целом.

Степень обоснованности и достоверности положений, выводов, заключения и рекомендаций

Диссертационная работа выполнена на большом клиническом материале. Исследуемая группа составила 700 пациентов с раком молочной железы, подразделённых на несколько подгрупп в зависимости от задачи и метода исследования. Полученные данные проанализированы с использованием современных методов биоинформатического анализа данных микроматричного экспрессионного профилирования и секвенирования РНК, включая функциональное аннотирование дифференциально-экспрессирующихся генов, и статистической обработки, в частности t-критерий Стьюдента и тест Вальда с поправкой на множественные сравнения Бенджамини-Хохберга, тест ANOVA, линейная регрессия и коэффициент детерминации, иерархический кластерный анализ, тест Фридмана и Вилкоксона, критерии χ^2 и Фишера,

метод Каплан-Майера и логранговый критерий (log-rank test) и модель пропорциональных рисков Кокса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Также обсуждались различия на уровне тенденции ($p < 0,1$).

По результатам исследования опубликовано 63 работы, из них 18 статей в рецензируемых научных изданиях (ВАК), в том числе 15 – в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus. Получено два патента РФ на изобретение и 1 свидетельство на регистрацию базы данных.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена по классическому типу и изложена на 256 страницах, иллюстрирована 26 таблицами и 41 рисунком. Библиографический указатель включает 358 работ, из них 22 отечественные и 336 зарубежных авторов. В структуре диссертации 3 главы, заключение, выводы и практические рекомендации.

Введение представляет собой актуализацию проблемы внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и необходимости исследований её природы и механизмов вклада в эффективность терапии и опухолевую прогрессию.

Целью исследования является выявление клеточных и молекулярно-генетических факторов, ассоциированных с формированием внутриопухолевой морфологической гетерогенности инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа и её вкладом в эффективность неадьювантной химиотерапии и метастазирование.

Задачи полностью соответствуют поставленной цели и чётко сформулированы. Каждая из задач решена в полной мере в ходе диссертационной работы.

В первой главе представлен подробный обзор современной литературы, разделённый на несколько подглав. Рассмотрена история вопроса внутриопухолевой гетерогенности, её типы, гипотезы и механизмы формирования и роль в эффективности противоопухолевой терапии и прогрессировании онкологических заболеваний, в т.ч. перспективы и возможности лечения онкологических больных. Одним из типов рассмотрена внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы, выдвинуты гипотезы её формирования и освещено современное состояние относительно её вклада в эффективность терапии и прогрессирование рака молочной железы.

Во второй главе подробно описаны материалы и методы исследования, в частности морфологический анализ иммуофлюоресцентное окрашивание, лазерная микродиссекция, полногеномная амплификация и микроматричная сравнительная геномная гибридизация, выделение РНК, полнотранскриптомная амплификация,

микроматричное экспрессионное профилирование, количественная ПЦР, секвенирование РНК и статистическая обработка данных. Приведён дизайн диссертационной работы.

В третьей главе в виде отдельных подглавописаны и проиллюстрированы результаты проведённых исследований. в частности приведены микрофотографии пространственной организации морфологических структур, данные по количеству опухолевых стволовых клеток в них, охарактеризован их цитогенетический и транскрипционный профиль, особенности микроокружения, метастатический и химиорезистентный фенотип. Обоснована и экспериментально подтверждена валидность внутриопухолевой морфологической гетерогенности как модели для идентификации маркёров метастазирования. На основании полученных результатов предложена модель формирования внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы и её вклада в клиническое течение и эффективность терапии заболевания.

В заключении автор кратко подытожил полученные результаты и провёл их сравнение с литературными данными.

Выводы полностью соответствуют поставленным задачам. На основании полученных результатов предложены практические рекомендации по оценке вероятности развития гематогенных метастазов на основе учёта внутриопухолевой морфологической гетерогенности.

Рекомендации для использования результатов и выводов

Полученные результаты имеют несомненную научную и практическую ценность. Внутриопухолевую морфологическую гетерогенность рака молочной железы следует использовать как исследовательскую модель для изучения механизмов опухолевой пластичности и метастазирования и поиска новых прогностических маркеров и терапевтических мишеней. Данные цитогенетического и транскриптомного профилирования различных морфологических структур, размещенные автором диссертационной работы, на специализированном ресурсе GeneExpressionOmnibus (GEO) могут применяться для идентификации сигнатур, ассоциированных с химиорезистентностью и гематогенным метастазированием. Данные о связи внутриопухолевой морфологической гетерогенности с вероятностью гематогенного метастазирования могут быть внедрены в практику работы онкологических учреждений с целью раннего обнаружения или предупреждения прогрессирования рака молочной железы.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний диссертационная работа не содержит. Обнаруженные замечания имеют стилистический характер и не влияют на положительную оценку данной работы. Так, например, в названии диссертации следовало бы поставить двоеточие, а между словами молекулярно и генетические поставить дефис (внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы: клинические и молекулярно-генетические особенности).

В порядке дискуссии хотелось бы с автором обсудить несколько вопросов. Так, например, диссертант строит свои умозаключения об активации тех, или иных сигнальных путей, в основном по данным полнотранскриптомного профилирования и РНК секвенирования. При этом, не учитывая, что как любой омиксный подход, оно требует подтверждения ортогональным методом, например, проверкой экспрессии генов-мишеней с помощью обратной транскрипции, сопряженной с ПЦР в реальном времени.

Также, в качестве пожеланий на будущее, хотелось бы увидеть больше функциональных экспериментов, которые направлены на валидацию гипотезы диссертанта. Например, чтобы оценить функциональную значимость генов-мишеней для лекарственной резистентности, было бы интересно сравнить клетки с пониженной экспрессией этих генов по отношению к исходным клеткам, в экспериментах на клеточных моделях.

Заключение

Диссертационная работа Денисова Евгения Владимировича на тему «Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы. Клинические и молекулярно-генетические особенности», представленная на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6 – онкология, лучевая терапия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решается актуальная научная проблема – понимание природы клинически значимого феномена внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы.

По своей новизне, научно-практической значимости полученных результатов, количеству публикаций, актуальности методологическому уровню, диссертация Денисова Е.В. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в ред. от 21.04.2016 г. № 335 и 02.08.2016 г. № 748, 01.10.2018 № 1168, в ред. от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на

соискание учёной степени доктора биологических наук, а автор заслуживает присуждения
искомой степени доктора биологических наук по специальности 3.1.6 – онкология,
лучевая терапия.

Заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук,
доктор биологических наук, профессор РАН

Барлев Николай Анатольевич



«27» октября 2022 г

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных.

Подпись доктора биологических наук, профессора РАН Барлева Николая Анатольевича
заверяю:

Тюряева И.И.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии
наук, 194064, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект 4, тел. 8 (812) 297-18-29,
email: cellbio@incras.ru, веб-сайт: <http://www.incras.ru>