

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отделения прогноза эффективности консервативного лечения МНИОИ им.П.А.Герцена

- филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России на диссертационную работу ЗАХАРЕНКО Маргариты Владимировны «Молекулярно-генетические исследования в оптимизации диагностики колоректального рака», представленную на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия

Актуальность избранной темы

Внедрение в ряде стран программ скрининга, включающих современные методы эндоскопической диагностики и/или исследование кала на скрытую кровь, демонстрируют существенное снижение темпов роста заболеваемости раком толстой кишки (РТК). Совершенствование методов лечения приводит к снижению показателей смертности от РТК, в том числе, и в России. Тем не менее, отсутствие на ранних стадиях специфических клинических симптомов опухолевого поражения толстой кишки часто является причиной поздней диагностики заболевания. Так, в России примерно в четверти случаев пациенты впервые обращаются за помощью, имея метастатическую стадию РТК, и этот показатель остается неизменным на протяжении последних десяти лет. Объективная сложность выполнения эндоскопического исследования при профилактических обследованиях и недостаточная чувствительность и специфичность лабораторных тестов исследования кала на скрытую кровь, делают крайне востребованным появление новых информативных методов ранней диагностики колоректального рака.

Классические сывороточные маркеры, такие как РЭА или СА19-9, сегодня применяются для мониторинга больных РТК после лечения, однако их значимость для ранней диагностики опухоли невелика. На протяжении последних двух десятков лет ведется активный поиск биологических

маркеров, ассоциированных с РТК, доступных для определения в крови или содержимом кишечника. В число маркеров-кандидатов входят мутации и фокусы метилирования ДНК, некодирующие РНК, белки, регулирующие процессы пролиферации, адгезии и неоангиогенеза, аутоантитела, цитокины, метаболиты и состав микробиома. Современный уровень развития молекулярно-биологических технологий, накопленные знания о молекулярном патогенезе РТК, ставшее рутинным использование молекулярно-генетических методов анализа в клинической практике создают многообещающие предпосылки для развития этого направления.

Необходимо подчеркнуть, что РТК – одно из наиболее изучаемых злокачественных новообразований, однако механизмы возникновения его спорадических форм еще далеки от понимания. Нацеленность на обнаружение предопухолевых нарушений или скрытых очагов малигнизации делает логичным интерес к изучению морфологически неизменной слизистой оболочки, как перитуморальной, так и располагающейся на удалении от опухоли. Считается, что эпителий может быть возможным носителем врожденных или приобретенных фенотипических особенностей, которые предрасполагают клетки эпителия к злокачественной трансформации или способствуют прогрессии патологических нарушений. Целый ряд публикаций демонстрируют отличия морфологически нормального эпителия толстой кишки у больных РТК от кишечного эпителия у здоровых лиц, больных полипами или колитом по данным молекулярно-генетического и транскриптомного анализов, показателям клеточной инфильтрации. Изменения, регистрируемые в неизменной слизистой оболочке при раке, затрагивают самые разные функциональные характеристики ткани – от пролиферации и метаболизма клеток до активности провоспалительных сигналов.

Исследование Захаренко Маргариты Владимировны направлено на разработку метода дифференциальной диагностики патологических процессов в толстой кишке на основе исследования профилей экспрессии

генов в морфологически неизмененных тканях разных отделов толстой кишки и, несомненно, является актуальным и вызывает значительный интерес.

Степень достоверности и обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа выполнена согласно общепринятым принципам и нормам клинико-лабораторного исследования. Достоверность полученных результатов подкреплена репрезентативным количеством наблюдений, грамотной характеристикой клинических групп, методичным описанием процедур получения материала для исследования, ясным и последовательным изложением этапов исследования и использованных в нем подходов.

Автором исследованы 926 образцов тканей, полученных у 253 больных РТК, 84 больных с доброкачественной патологией и 95 лиц, не имеющих заболевания толстой кишки. Изучена экспрессия широкой панели генов, относящихся к различным функциональным кластерам, которые отражают состояние ткани по основным биологическим характеристикам, потенциально связанным с патогенезом неопластических изменений. Сравнительная характеристика экспрессии генов выполнена в репрезентативных группах наблюдений с использованием адекватных методов статистического анализа.

Выводы и положения, выносимые на защиту сформулированные в диссертации, соответствуют поставленным задачам, непосредственно следуют из результатов выполненного автором исследования, сформулированы лаконично и, в целом, корректно.

Новизна полученных результатов диссертационного исследования

Автором выполнено оригинальное исследование, в котором проведено комплексное сравнение экспрессии широкой целевой панели генов-кандидатов в образцах различных отделов толстой кишки в норме и при патологии, выявлены отличия профиля этой экспрессии. Впервые описаны

отличия экспрессии ряда генов-кандидатов из изученной панели в материале соскобов со слизистой оболочки прямой кишки у здоровых лиц, больных с полипами, воспалительными заболеваниями и карциномой толстой кишки. Новизна полученных результатов, в сопоставлении с данными опубликованных исследований, сомнений не вызывает.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Полученные автором сведения о существовании принципиальных отличий экспрессии целого ряда генов в разных анатомических отделах толстого кишечника в норме и при патологии могут являться основой дифференцированного подхода к интерпретации данных молекулярно-генетического анализа. Это создает новые аспекты для фундаментального изучения процессов, которые сопровождают развитие полипов и злокачественных опухолей в толстой кишке. Установленная автором связь между фенотипическими особенностями слизистой оболочки прямой кишки и характером заболевания толстой кишки в целом является предпосылкой к разработке подхода к разработке малоинвазивного метода исследования, который может быть полезен в рамках амбулаторного обследования для оценки риска наличия опухолевого заболевания толстой кишки.

Структура диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану. Рукопись представляет собой 146 страниц машинописного текста, который сопровождается 31 таблицей, структурирующих фактический материал, и 9 рисунков, иллюстрирующих дизайн, методические аспекты и результаты обобщения данных.

Во **Введении** автор обосновывает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, представляет научную новизну исследования и его научно-практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения, касающиеся апробации работы и публикаций по теме диссертации.

В **Обзоре литературы (Глава 1)** автор рассматривает молекулярные аспекты клеточного гомеостаза кишечного эпителия в норме, роль микробиоты и лимфоидной системы кишечника в поддержании этого гомеостаза; излагает современные представления о молекулярных механизмах развития злокачественных опухолей в слизистой оболочке толстого кишечника; подчеркивает особенности карцином, ассоциированных с хроническими воспалительными заболеваниями кишечника и зубчатыми аденомами. Тем самым, автор приводит обоснование для выбора целевой панели генов в своем исследовании. В обзоре даны общие представления о современных методах диагностики и скрининга РТК, в том числе, о новых разработках, проходящих сегодня клиническую апробацию (OncotypeDX® Colon Cancer Assay и ColoPrint), основанных на методах микроматричного анализа и полимеразной цепной реакции.

Заключительный раздел Обзора посвящен исследованиям морфологически неизменной ткани при злокачественных опухолях различных локализаций. Принимая во внимание доступный набор публикаций о результатах молекулярно-генетических исследований перитуморальной и неизменной слизистой оболочки при РТК, хочется выразить сожаление, что автор не уделил больше места в этом разделе именно данному вопросу.

В целом, Обзор литературы представлен обстоятельно, последовательно, написан хорошим литературным языком и легко читается.

В **Главе 2 – Материалы и методы исследования**, автор представляет общую структуру исследования; описывает принцип формирования групп обследованных лиц и дает их клиническое описание; четко и во всех деталях приводит технические и топологические особенности получения биологического материала; поэтапно излагает методологию основных методов исследования – от выделения матричной РНК из образцов ткани до выполнения ПЦР и принципов обсчета полученных результатов; перечисляет методы статистического анализа, использованные в работе. Таблица, в

которой автор приводит краткую функциональную характеристику генов, отобранных для исследования, является своеобразным справочником для читателя, что облегчает знакомство с рукописью.

Сведения, содержащиеся в этой главе, и форма их представления свидетельствуют о высокой квалификации автора и грамотном походе к анализу клинического материала.

Глава 3 посвящена собственным результатам исследования и их обсуждению. Первая часть этой главы представляет результаты сравнительного исследования экспрессии 62 генов, относящихся к разным функциональным категориям, в различных анатомических отделах толстой кишки – у лиц без заболевания толстой кишки, при полипах и при РТК. С использованием объективного подхода – метода дискриминантного анализа, характеризует достоверные фенотипические отличия исследованных тканей, в том числе, в зависимости от возраста обследованных и клинико-морфологических особенностей заболевания. Статистические выкладки выполнены корректно, с применением адекватных математических инструментов анализа. Главный вывод этой части исследования – это существенные отличия молекулярного фенотипа слизистой оболочки кишечника у больных РТК от молекулярного фенотипа в норме и при доброкачественных поражениях.

Во второй части главы автор приводит алгоритм формирования панели генов для исследования материала соскобов со слизистой оболочки прямой кишки. Представленные автором данные о применении разработанной модели к анализу материала соскобов при РТК, полипах толстой кишки и неспецифических воспалительных заболеваниях кишечника свидетельствуют о впечатляющих возможностях метода. Автор формирует целевые наборы генов, которые могут быть использованы в формате скрининга или на этапе диагностического обследования для оценки риска наличия патологических изменений в кишечнике.

Вызывает безусловное уважение огромный объем выполненной работы, ее аккуратность и тщательность, обоснованность каждого шага при анализе большого массива данных, что дало возможность найти значимые системные корреляции.

Необходимо особо подчеркнуть, что выбор автором панели генов, с одной стороны, определяется фундаментальной парадигмой современных исследований в онкологии, с другой стороны – находится в контексте широко обсуждаемых в литературе моделей патогенеза новообразований, в частности, концепции «опухолевого поля», либо перекликается с представлениями об онкологической патологии как о системном заболевании. Автор регулярно вводит пояснения к функциональной активности лидерных генов-кандидатов и возможной патофизиологической роли их продуктов, что служит связующим звеном между выявленными молекулярными особенностями и возможными биологическими эффектами, которые они опосредуют, что следует отнести к несомненным достоинствам работы.

В заключении автор еще раз обозначает основные предпосылки исследования, методические подходы и концентрирует внимание на основных результатах, имеющих потенциальное практическое применение.

Диагностическая значимость разработанного автором алгоритма для скрининга или дифференциальной диагностики, как самостоятельного исследования или в сочетании с уже применяющимися лабораторными тестами, безусловно, нуждается в подтверждении на валидационной когорте, а в последующем – и в расширенных клинических испытаниях. Тем не менее, из представленных автором результатов следует целесообразность и правомочность проведения таких исследований.

Список литературы включает 164 источника, из которых 22 – отечественные и 142 – зарубежные издания, и тщательно выверен. Материалы диссертационных исследований опубликованы в научных

изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, и представлены на отечественных и международных научных форумах.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат, в целом, отражает суть и основные положения диссертационной работы.

Замечания по работе

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению работы нет. Вместе с тем, имеется ряд ремарок, которые носят рекомендательный характер.

Так, обращает на себя внимание несколько категоричная формулировка вывода 5. Утверждение о том, что «отличия [экспрессии генов – Т.А.] могут быть использованы для скрининга и дифференциальной диагностики патологии толстой кишки», все-таки, требует подтверждения в валидационном исследовании. Положение, вынесенное на защиту, соответствующее этому выводу, сформулировано в этом плане более корректно.

Представляя результаты анализа экспрессии генов в зависимости от исследованного отдела толстой кишки у здоровых лиц, больных с полипами и больных РТК, автор ограничивается характеристикой статистических отличий уровня экспрессии и обсуждением числа этих отличий, но не приводит непосредственно количественные данные, которыми, безусловно, располагает. Нужно признать, что значительный объем этих данных, конечно, перегрузил бы рукопись фактическим материалом. Но, с другой стороны, их отсутствие в материалах диссертации не дает возможности составить представление о характере изменений экспрессии отдельных генов или их групп. Рекомендуется автору в последующей работе подобрать способ компактного и репрезентативного представления подобного материала.

Хотелось бы также отметить, что хотя автор располагает первичным материалом, характеризующим состояние слизистой оболочки кишечника в норме, при полипах и при РТК, результаты прямого сравнительного анализа

этих групп наблюдений в диссертацию не вошли. При знакомстве с результатами исследования закономерно возникает интерес и о возможной корреляции выявленных вариаций молекулярного фенотипа в зависимости от локализации очагов опухолевого поражения в кишечнике. Включение этих данных в диссертационный труд стало бы еще одним весомым аргументом в пользу сделанных автором выводов и, возможно, позволило бы обозначить дополнительные критерии для дифференциальной диагностики.

В плане дискуссии хотелось бы задать автору ряд вопросов:

1) Некоторые особенности молекулярного фенотипа тканей прямой кишки коррелируют со степенью дисплазии эпителия полипов, их гистологическим типом, а также с клинико-морфологическими характеристиками заболевания при РТК. Принимая во внимание протяженность слизистой оболочки кишечника, физиологические и гистологические различия ее анатомических отделов, можно ли предположить, какие системные механизмы лежат в основе этих корреляций?

2) Планируется ли апробация разработанного автором подхода на валидационной когорте и можно ли описать предполагаемый дизайн этих исследований (критерии включения, количество наблюдений, критерии оценки эффективности метода)?

Заключение

Диссертационная работа Захаренко Маргариты Владимировны «Молекулярно-генетические исследования в оптимизации диагностики колоректального рака» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – характеристику профилей экспрессии генов в морфологически неизмененных тканях разных отделов толстой кишки в норме и при патологии, и направлена на разработку новых информативных методов ранней диагностики опухолевых заболеваний толстой кишки. Научные результаты диссертации могут быть квалифицированы, как значимые для фундаментальной и клинической онкологии. Работа заслуживает

положительной оценки по актуальности решаемых задач, новизне полученных результатов и высокому уровню методического исполнения.

Диссертация соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. №751), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автору может быть присуждена искомая ученая степень кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник отделения прогноза
эффективности консервативного лечения
МНИОИ им.П.А.Герцена - филиала ФГБУ
«НМИЦ радиологии» Минздрава России

Т.А. Кармакова

«14» декабря 2021 г.

Подпись руки доктора биологических наук Кармаковой Т.А. заверяю

Ученый секретарь

МНИОИ имени П.А. Герцена - филиала ФГБУ

«НМИЦ радиологии» Минздрава России



Е.П. Жарова

Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена (МНИОИ им.П.А.Герцена) - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России). Адрес: 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3. Тел. +8 (495) 945-74-15; +7 (906) 771-89-81. E-mail: kalmar123@yandex.ru