

«УТВЕЖДАЮ»

Директор ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии

им. ак. Н.Н. Бурденко»

Минздрава России

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

А.А. Потапов

«28» 12 2018 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Строгановой Анны Михайловны на тему: «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы», представленной к защите в диссертационный совет Д 001.017.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.02.12 – онкология.

Актуальность темы диссертации

Нейробластома – наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста. Нейробластома составляет 7-10% всех злокачественных опухолей детского возраста, включая лейкозы. Общая заболеваемость нейробластомой составляет 1 случай на 100 000 детей от 0 до 15 лет. Средний возраст заболевания - 18 месяцев, при этом нейробластома у 50% пациентов диагностируется в возрасте 2 лет и у 90% - до 6-летнего возраста.

Разнообразное клиническое поведение этой опухоли, от спонтанной дифференцировки и регрессии у некоторых пациентов до быстрого прогрессирования, несмотря на интенсивную терапию во многих других случаях, привело к интенсивному изучению биологических и

прогностических характеристик нейробластомы. Одной из принципиально важных проблем для клиники нейробластомы является сложность установления прогноза и определение тактики лечения.

Наряду со многими параметрами клинического характера многообещающими оказались ряд гистологических, молекулярно-биохимических и генетических характеристик опухолевых клеток. Однако наибольшее значение в выборе оптимального объема лечения, установлении прогноза, устойчивости к химиотерапии приобрело изучение состояния гена *MYCN* - клеточного протоонкогена, семейства транскрипционных факторов. Амплификация гена *MYCN* наблюдается в 20-25% первичных нейробластом и является одним из главных показателей агрессивности заболевания, ранней устойчивости к химиотерапии и неблагоприятного прогноза. Амплификация этого гена – мощнейшая «сила» увеличения митотической активности и предотвращения созревания опухоли.

Клеточная гетерогенность – важный признак нейробластомы. Клеточная гетерогенность и степень созревания нейробластомы коррелируют с клиническим поведением, и эти свойства используют при классификации и прогнозе заболевания.

Исследования, посвященные изучению экспрессии белка CRABP1 при нейробластомах актуальны, если принять во внимание, что белок CRABP1 выполняет основную функцию в связывании РК и, предположительно, снижении ее транскрипционной активности, а последняя играет важную роль в процессах дифференцировки нервной ткани.

Таким образом, становится понятно, что работы, посвященные изучению механизмов и типов амплификации, клеточного состава нейробластомы и экспрессии белков чрезвычайно актуальны в контексте прогноза, определения рекомендаций и подготовки специфического лечения.

Научная новизна

Выполненная работа является комплексным, многофакторным исследованием.

Автором впервые получены данные по амплификации гена *MYCN* на одной из пары вторых хромосом, т.е. зафиксированы ранние признаки амплификации. Впервые получены данные по культивированию клеток первичной тканевой культуры нейробластомы. Отмечены преимущества использования тканевых культур для проведения FISH-реакции. Проведенное исследование является первой работой по изучению экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах, ее связи с уровнем дифференцировки опухоли и оценки эффекта проведенной терапии.

Научно-практическая значимость

Полученные данные о статусе гена *MYCN*, разных типах амплификации в разных возрастных группах могут быть использованы в клинике при планировании наблюдения и терапии этих больных.

Показанная автором впервые способность клетки к экстррузии (удалению) лишнего генетического материала должна стать предметом дальнейшего углубленного изучения клинических особенностей нейробластомы для определения прогноза, планирования тактики лечения и оценки эффекта проведенной терапии.

Полученные данные об амплификации гена *MYCN* на одной из пары вторых хромосом могут служить дополнительным критерием определения группы риска нейробластомы и включения метода культивирования в комплексную диагностику нейробластомы.

Определение уровня экспрессии белка CRABP 1 может быть использовано в клинике для более точной оценки дифференцировки опухолевых клеток до и после проведенного лечения.

Достоверность и обоснованность

Цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, сформулированы ясно и убедительно. Автором изучены соотношения типов амплификации в созревающих и недифференцированных нейробластомах, а также у детей младше и старше 1 года.

Проведенное исследование позволило составить прогностически неблагоприятный комплекс для нейробластомы, определить значимость метода тканевых культур в диагностике нейробластомы.

Представленные в работе теоретические положения, выводы и методические подходы основаны на глубокой и тщательной проработке значительного ретроспективного и проспективного материала с применением комплекса современных методов. Значительный объем данных, полученный при непосредственном участии автора, убеждает в обоснованности и достоверности полученных результатов.

Оценка содержания работы

Диссертация написана согласно современным требованиям и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, раздела, содержащего собственные результаты, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы. Список литературы включает 95 отечественных и зарубежных источников. Материалы диссертации изложены на 120 страницах машинописного текста и иллюстрированы 3 таблицами и 19 рисунками.

Во введении автор детально определяет актуальность исследования, формулирует цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, представляет степень достоверности и результаты апробации работы, а также положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор, представленный на 24 стр., содержит подробные сведения, касающиеся истории изучения нейробластомы, ее общей характеристики и клинических стадий; представлены гистологическое строение и факторы, определяющие прогноз заболевания. Подробно даны характеристика и функции гена *MYCN*, определено понятие «амплификации», описаны механизмы ее формирования, типы и их прогностическое значение при нейробластоме. Литературный обзор написан хорошим языком и позволяет определить место и значение выполненного исследования в системе существующих научных положений, указывает на

актуальность проблемы разработки принципов прогноза и оценки эффективности проведенной терапии в случае нейробластомы.

В главе «Материалы и методы» (13 стр.) описаны модификации метода FISH на мазках-отпечатках и парафиновых срезах опухоли, отмечены преимущества использования FISH с применением высокого давления. Подробно освещена методика получения и культивирования первичных тканевых культур нейробластомы с последующим проведением FISH исследования на метафазных хромосомах. Приведены методы статистического анализа данных, использованные в работе.

Глава «Результаты» занимает объем 50 стр. Автором проведена работа по изучению статуса гена *MYCN* у 262 пациентов с диагнозом нейробластома в возрасте от рождения до 17 лет, описаны варианты распределения сигналов гена *MYCN* и центромерных сигналов в клетках нейробластомы. Описаны 3 типа амплификации гена *MYCN* и феномен экстрезии (удаления) амплифицированных последовательностей посредством образования микроядер.

При культивировании клеток нейробластомы были выделены 4 уровня клоногенности опухолевого материала, описаны стадии развития первичных тканевых культур и выделены три основных типа клеток. При сопоставлении клеточного состава тканевой культуры с микроструктурой нейробластомы было отмечено, что во всех вариантах нейробластомы, содержащих то или иное количество незрелых нейробластов, при культивировании обязательно росли клетки I-типа. Следует подчеркнуть, что проведение FISH-реакции на материале культуры тканей давало возможность оценивать статус гена *MYCN* как в интерфазных ядрах, так и в метафазных структурах, что впервые позволило наблюдать интересную особенность - признаки амплификации гена *MYCN* только на одной из пары вторых хромосом.

Впервые была изучена экспрессия белка CRABP1 в образцах нейробластомы разной степени дифференцировки и с различными генетическими нарушениями. Было отмечено, что степень и интенсивность

экспрессии белка CRABP1 отличается в нейробластомах разной степени зрелости и зависит от наличия генетических нарушений. Представлены данные, касающиеся изменения экспрессии белка CRABP1 в процессе терапии нейробластомы. Отмечено, что при увеличении степени дифференцировки опухоли после лечения происходит увеличение уровня экспрессии белка CRABP1 в опухолевых клетках. Этот феномен можно использовать при составлении общей морфологической характеристики опухоли и для оценки эффективности проведенной терапии.

В главе «Обсуждение» (12 стр.) автором проводится обсуждение полученных результатов исследований. Проводится подробный сравнительный анализ всей совокупности данных, имеющих в мировой и отечественной литературе, и детальное обсуждение результатов, что дает основания для формирования полноценных выводов.

Выводы целиком вытекают из результатов исследования.

Автореферат и 4 публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ, полно отражают результаты исследования.

Рекомендации по внедрению результатов исследования

Рекомендуется внедрение метода культивирования опухолевых клеток и последующего проведения метафазного FISH исследования в комплексную диагностику нейробластом для более точного определения прогноза заболевания.

Замечания

Принципиально важных замечаний нет. Отдельные стилистические ошибки не влияют на качество диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Строгановой Анны Михайловны на тему: «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является самостоятельной законченной научно-исследовательской работой, в которой содержится решение важной и актуальной цели - разработке

комплекса методик для уточнения диагноза нейробластомы, установления прогноза, определения тактики лечения и эффекта проведенной терапии.

Выводы и рекомендации достаточно обоснованы. По совокупности критериев работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор, Строганова Анна Михайловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Отзыв заслушан и обсужден на заседании проблемной комиссии «Биология и комплексное лечение опухолей» 26 декабря 2018 года. Протокол № 6 от 26.12.2018

Заведующий патологоанатомическим
отделением ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии
им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России
д.м.н.



Рыжова М.В.

Подпись д.м.н. М.В. Рыжовой заверяю

Ученый секретарь ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии
им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России
к.м.н.



Данилов Г.В.

ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Адрес: Россия 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская, д.16

Тел. +7 (499) 251-35-55

Эл. почта: info@nsi.ru

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора руководителя научного отдела Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно – практический центр специализированной медицинской помощи детям им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы» Шароева Тимура Ахмедовича на диссертационную работу Строгановой Анны Михайловны на тему: «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности **14.01.12** онкология

Актуальность темы исследования

Нейробластома является типичной эмбриональной опухолью детского возраста и характеризуется значительной вариабельностью клинического течения от возможности развития спонтанного регресса опухоли, преимущественно у детей раннего возраста, до непрерывно прогрессирующего течения у детей старшего возраста. Следует отметить, что в настоящее время, как и при многих других видах злокачественных новообразований детского возраста, стратегия лечения должна строиться на дифференцированном подходе и быть адаптированной к характеристикам опухоли на момент постановки диагноза.

Существенной проблемой для врачей-клиницистов является сложность установления прогноза заболевания для оптимизации тактики лечения. При этом наибольшее значение приобрело изучение состояния гена *MYCN*. Ген *MYCN* был первым онкогеном в солидных опухолях, у которого была обнаружена амплификация. Механизм амплификации при опухолевой патологии остается весьма спорным. Поэтому изучение механизмов, которые приводят к амплификации является наиболее важным при опухолях человека.

Помимо этого, важным признаком нейробластомы является клеточная гетерогенность и степень дифференцировки, которые коррелируют с клиническим поведением, и эти свойства используют при классификации и прогнозе заболевания.

Исследования, посвященные изучению экспрессии белка CRABP1 при нейробластомах в зависимости от уровня клеточной дифференцировки актуальны, если принять во внимание, что изменение экспрессии этого белка является прогностическим маркером в ряде опухолей и белок CRABP1 выполняет основную функцию в связывании ретиноевой кислоты и, предположительно, снижении ее транскрипционной активности.

В этой связи исследования, посвященные разработке и оптимизации комплекса молекулярно-генетических методов определения диагностических и прогностических маркеров нейробластомы, являются актуальными.

Научная новизна

Выполненная работа является комплексным исследованием, посвященному изучению особенностей клеток нейробластомы. Впервые показана способность клеток к экстррузии лишнего генетического материала в случаях с амплификацией гена *MYCN*. Впервые получены данные по культивированию клеток первичной тканевой культуры нейробластомы, описано соотношение различных морфологических типов клеток в культуре в зависимости от микроскопической структуры нейробластомы и получены данные по амплификации гена *MYCN* на одной из пары вторых хромосом.

Впервые получены данные по изменению экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах в зависимости от уровня клеточной дифференцировки.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Работа имеет практическое значение, поскольку может служить обоснованием включения метода первичных тканевых культур в комплексную диагностику нейробластом. Изменение уровня экспрессии белка CRABP1 служит дополнительным критерием оценки дифференцировки опухолевых клеток.

Оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа написана литературным языком, построена по традиционному плану и состоит из введения, 4 глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», Выводов, Список сокращений, Список использованной литературы, состоящего из 95 отечественных и зарубежных источников). Материалы диссертации изложены на 120 страницах формата А4, иллюстрированы 3 таблицами и 19 рисунками.

Во введении автор определяет актуальность исследования, формулирует цель и задачи исследования, обосновывает научную новизну и практическую значимость исследования. Автор описывает методологию и методы исследования, представляет положения, выносимые на защиту, определяет степень достоверности результатов.

В главе **«Обзор литературы»** описаны история изучения и характеристика нейробластомы, отражены уникальные черты ее биологического поведения. В данной главе подробно описаны функции гена *MYCN*, статус которого имеет наибольшее значение в установлении прогноза заболевания и выборе тактики лечения. Описаны механизмы и типы амплификации, а также наиболее частые хромосомные aberrации. Автором отмечено значение изучения свойств клеток нейробластомы *in vitro* и *in vivo*, а также дано обоснование для изучения экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах разной степени дифференцировки. Диссертант владеет современным научным материалом по изучаемой проблеме и использует его для обоснования собственных положений в диссертации. Принципиальных замечаний по данной главе нет.

Глава **«Материалы и методы исследования»** содержит описание анализируемого материала. Подробно изложены методы, использованные в диссертационной работе:

- модификации FISH-методики на мазках-отпечатках и парафиновых срезах опухоли;

- пошаговая инструкция получения первичных тканевых культур нейробластомы с последующим получением фиксированного материала опухолевых клеток и проведения FISH-исследования;
- иммуногистохимический метод для изучения экспрессии белка CRABP1, статистические методы оценки.

Объем изученного материала и использованные методы анализа не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов исследования.

Принципиальных замечаний по главе нет.

В главе «**Результаты**» изложены данные по изучению статуса гена *MYCN* на мазках-отпечатках и парафиновых срезах опухоли, подробно описаны варианты распределения центромерных сигналов 2 хромосомы и сигналов гена *MYCN* в ядрах опухолевых клеток. Рассмотрены 3 типа амплификации гена *MYCN*, дана их подробная характеристика и описан феномен экструзии лишнего генетического материала посредством образования микроядер. Этот феномен сам по себе интересен и требует дальнейшего изучения для оценки свойств опухолевой клетки.

Приведена культурально-морфологическая характеристика 23 образцов нейробластомы. Был проведен анализ полученных первичных тканевых культур, выделено 4 уровня клоногенности опухолевого материала и выделены основные три типа клеток: I-, S- и N-. Проведено сопоставление клеточного состава тканевой культуры с микроструктурой нейробластомы, из которой она была получена и отмечено, что во всех вариантах нейробластомы, содержащих то или иное количество незрелых нейробластов, при культивировании обязательно росли клетки I-типа. Отмечены преимущества использования метода FISH для определения статуса протоонкогена *MYCN* в геномах культивированных клеток нейробластомы – детекция амплификации гена только на одной из пары вторых хромосом, т.е. такой подход позволил определять ранние признаки амплификации гена. Примечательно, что наиболее злокачественные по культурально-

морфологическим характеристикам варианты нейробластомы, представленные недифференцированными клетками I-типа, не имели амплификации гена *MYCN*.

Впервые была изучена экспрессия белка CRABP1 в образцах нейробластомы разной степени дифференцировки и с различными генетическими нарушениями, в результате была получена статистически достоверная зависимость между уровнем экспрессии белка CRABP1 и степенью клеточной дифференцировки и статистически достоверная обратная зависимость от наличия генетических нарушений. Помимо этого, получены интересные данные, касающиеся увеличения уровня экспрессии белка CRABP1 в опухолевых клетках при увеличении степени дифференцировки опухоли после лечения. Эти результаты можно использовать при составлении общей морфологической характеристики опухоли.

В главе «Обсуждение результатов» автором был проведен подробный сравнительный анализ всех полученных результатов с данными, имеющимися в отечественной и мировой научной литературе.

Выводы обоснованы полученными результатами и соответствуют поставленным целям и задачам.

Сведения о полноте публикаций

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Замечания к работе:

В работе встречаются незначительные стилистические неточности, которые обсуждены с автором в устной беседе. Высказанные замечания не умаляют научного и практического значения работы.

Принципиальных замечаний по представленному научному труду нет.

Заключение:

Диссертационная работа Строгановой Анны Михайловны на тему: «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, направленной на разработку комплекса методик для уточнения диагноза нейробластомы и способных помочь в установлении прогноза болезни. Полученные в работе результаты помогут улучшить качество диагностики, выработать адекватную стратегию и тактику противоопухолевой терапии такого грозного опухолевого заболевания, каким является нейробластома детского возраста.

Современный дизайн исследования, адекватные подходы и методы его исполнения, достаточный объем полученных данных и их научная трактовка, а также высокая актуальность и новизна исследования позволяют заключить, что диссертационная работа Строгановой Анны Михайловны полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Официальный оппонент:

Руководитель научного отдела

ГБУЗ города Москвы

«Научно – практический центр специализированной медицинской помощи детям им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы»

доктор медицинских наук,

профессор



Шароев Тимур Ахмедович

Адрес:

119620 г. Москва ул. Авиаторов д. 38

Тел.: +7 (495) 735-09-27

Эл. почта: prsprakt@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора

Шароева Тимура Ахмедовича «заверяю»:

Директор Государственного бюджетного учреждения здравоохранения
города Москвы «Научно-практический центр специализированной
медицинской помощи детям имени В. Ф. Войно-Ясенецкого Департамента
здравоохранения города Москвы»,

доктор медицинский наук,

профессор



Притыко Андрей Георгиевич

23.01.19

ОТЗЫВ

Официального оппонента доктора медицинских наук, профессора кафедры патологической анатомии и клинической патологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России Талалаева Александра Гавриловича на диссертационную работу Строгановой Анны Михайловны на тему: «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 онкология.

Актуальность темы исследования

Нейробластома является опухолью из мутировавших монополярных нейробластов, по сути являющихся стволовыми клетками, в том числе и симпатической нервной системы что, по-видимому, определяет разнообразие свойств этого новообразования. Нейробластома встречается у плодов и в юношеском возрасте. Опухоль спорадическая, но могут встречаться и семейные случаи. Течение опухоли зависит от возраста, у детей первых двух лет жизни она протекает более благоприятно. Может самопроизвольно регрессировать или созревать до доброкачественной ганглионейромы, как в первичном узле опухоли, так и в метастазах. Нейробластома может иметь и крайне агрессивное течение, сопровождающееся распадом опухоли и обширным лимфогенным и гематогенным метастазированием. Таким образом, изучение биологических процессов и прогноза развития нейробластомы, представляются крайне актуальными.

Исследование проблем дифференцировки нейробластов до и после проведенной терапии и спонтанного созревания нейробластов позволит повысить уровень оказания помощи пациентам.

Диссертация Строгановой А.М. посвящена разработке дополнительных методов исследования, направленных на определение генетического статуса нейробластомы, дифференцировки ее клеточного

состава и экспрессии регуляторных белков в прогнозе, определения рекомендаций и подготовки таргетной терапии. Данная работа позволяет объединить морфологические и молекулярно-генетические задачи. В работе Строгановой А.М. достаточно подробно исследуется статус гена *MYCN* в разных возрастных группах, использован метод культивирования опухолевых клеток для точной оценки клеточного состава нейробластомы и дальнейшего проведения более информативного FISH исследования на метафазных хромосомах и показана прогностическая ценность определения экспрессии белка CRABP 1 для более точной оценки дифференцировки опухолевых клеток до и после проведенной терапии.

Основное содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Строгановой А.М. изложена на 120 страницах машинописного текста. Оформлена по классическому принципу. Диссертация содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и список использованной литературы.

Во введении описана актуальность темы, ясно сформулирована цель и задачи исследования, представлена научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы. Принципиальных замечаний по данному разделу нет.

Обзор литературы посвящен истории изучения нейробластомы, ее клиническим стадиям и гистологическому строению. Описаны факторы, определяющие прогноз заболевания, раскрываются и современные достижения в этом вопросе. В этой главе рассматриваются характеристика и функции гена *MYCN*, как имеющие наибольшее значение в выборе оптимального объема лечения, установлении прогноза, устойчивости к химиотерапии. Введено понятие амплификации гена, типы и механизмы ее формирования, описаны особенности при нейробластоме, прогностическое значение и методы определения. Определено значение изучения свойств

клеток нейробластомы *in vitro* и *in vivo* и изменения экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах разной степени дифференцировки.

Обзор литературы раскрывает значимость применения различных методических подходов для определения прогноза нейробластомы, тактики лечения и эффекта проведенной терапии. Обзор литературы позволяет сформулировать актуальные цель и задачи в изучении нейробластомы.

Раздел материалы и методы исследования посвящен подробному описанию методов, использованных для решения поставленных задач: модификациям флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), культивирования опухолевых клеток и получение фиксированного материала для дальнейшего цитогенетического исследования, иммуногистохимическому исследованию экспрессии белка CRABP1, статистическому анализу данных.

В разделе результаты подробно описано распределение сигналов гена *MYCN* и центромеры 2 хромосомы в нейробластомах разной степени дифференцировки на мазках-отпечатках и парафиновых срезах опухоли. Отмечены преимущества использования мазков-отпечатков в оценке статуса гена *MYCN*. Описаны 3 типа амплификации гена *MYCN* и определено соотношение типов амплификации в созревающих и недифференцированных нейробластомах и у детей в зависимости от возраста (младше и старше 1 года).

Также в данном разделе проведена оценка значения метода получения первичных тканевых культур с последующим FISH-анализом. Дана культурально-морфологическая характеристика культивированных образцов нейробластомы, описано различное соотношение 3 морфологических типов клеток (I-, S-, N-) в зависимости от гистологического строения опухоли, выделено 4 уровня клоногенности опухолевого материала и стадии развития первичных тканевых культур. Отмечено, что проведение FISH-реакции на материале культуры тканей давало возможность определять признаки амплификации невидимые на парафиновых срезах и мазках-отпечатках опухоли.

Впервые было изучено изменение экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах разной степени дифференцировки, полученные результаты свидетельствуют о наличии статистически достоверной зависимости между уровнем экспрессии белка CRABP1 и степенью клеточной дифференцировки. Была проведена оценка экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах до и после проведенной терапии и степень клеточной дифференцировки в изученных опухолях. Отмечено, что в отдельных случаях при увеличении степени дифференцировки опухоли после лечения происходило увеличение экспрессии белка CRABP1 по сравнению с первоначальной биопсией. Этот факт можно использовать для более точной оценки морфологической характеристики опухоли до и после проведенной терапии.

Раздел обсуждение результатов представлен подробным анализом результатов исследования. Проведено детальное сопоставление полученных результатов с данным мировой научной литературы. Принципиальных замечаний по данному разделу нет.

Выводы грамотно сформулированы и соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Замечаний к работе нет.

Степень научной новизны результатов, представленных автором

Описан феномен экструзии в опухолевых клетках нейробластомы - способность удалять лишний генетический материал из ядра путем образования микроядер.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности пересмотра значения метода тканевых культур в диагностическом процессе у больных с нейробластомами. Особо следует отметить ряд результатов, касающихся использования тканевых культур для проведения FISH-реакции. Принципиально важно то обстоятельство, что результаты FISH-реакции, проведенной на тканевой культуре, не только совпали с результатами,

проведенными на парафиновых срезах, но и в отдельных случаях превзошли их по точности.

Проведенное исследование является первой работой по изучению экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах, ее связи с уровнем дифференцировки опухоли и оценке эффекта проведенной терапии.

Оценка научно-практической значимости исследования

Работа имеет теоретическое и практическое значения. Культура нейробластомы - чрезвычайно информативная модель с позиций применимости к клиническим задачам. Проведенные исследования и полученные при этом результаты дают основание для рекомендации метода культивирования опухолевых клеток в комплексной диагностике опухолей. Определение уровня экспрессии белка CRABP 1 может быть использовано в клинике для более точной оценки дифференцировки опухолевых.

Сведения о полноте публикаций

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.


Заключение

Диссертационная работа Строгановой Анны Михайловны на тему: «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Карселадзе Аполлона Иродионовича. В работе решена важная научная задача - разработка комплекса методик для уточнения диагноза нейробластомы, способных помочь в установлении прогноза, определении тактики лечения и эффекта проведенной терапии - имеющей существенное значение для онкологии. По актуальности, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертация Строгановой А.М. соответствует всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 (в редакции постановления

Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры патологической анатомии
и клинической патологии лечебного факультета
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор

 Талалаев А.Г.
21.01.2019

Адрес: 117997, г. Москва
ул., Островитянова д.1
Тел.: +7 (916) 690-29-53
Эл. почта: talalaev@mail.ru

Подпись Талалаева А.Г. заверяю

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России
доктор медицинских наук, доцент



 О.Ю. Милушкина

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Строгановой Анны Михайловны на тему: «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.01.12 онкология.

Нейробластома – наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста. Разнообразное клиническое поведение этой опухоли, от спонтанной дифференцировки (созревания в ганглионеврому) и регрессии у некоторых пациентов, до быстрого прогрессирования, привело к интенсивному изучению биологических и прогностических характеристик нейробластомы. Диссертационная работа Строгановой А.М. посвящена актуальной проблеме разработки комплекса методик для уточнения диагноза нейробластомы, установления прогноза, определения тактики лечения и эффекта проведенной терапии.

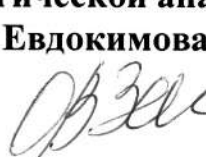
В работе Строгановой А.М. представлены данные по изучению статуса гена *MYCN* на мазках-отпечатках и парафиновых гистологических срезах нейробластомы разной степени дифференцировки, рассмотрены 3 типа амплификации гена *MYCN* и дана их подробная характеристика; приведена культурально-морфологическая характеристика образцов нейробластомы, проведено сопоставление клеточного состава тканевой культуры с микроструктурой нейробластомы, из которой она была получена. Отмечены преимущества использования FISH метода на метафазных хромосомах для определения статуса *MYCN* – на материале тканевых структур хорошо видны различные формы амплификации гена *MYCN*. Проведено исследование экспрессии белка CRABP1 методом иммуногистохимии, результаты которого свидетельствуют о наличии статистически достоверной зависимости между уровнем экспрессии белка CRABP1 и степенью клеточной дифференцировки, а также о статистически достоверной обратной зависимости от наличия генетических нарушений.

Автореферат диссертации Строгановой Анны Михайловны отражает актуальность темы исследования, ее научную новизну, научно-практическую значимость, результаты и выводы. Автореферат написан хорошим литературным языком и полностью соответствует по своему оформлению требованиям ВАК РФ и ГОСТу.

Диссертационная работа Строгановой А.М. «Молекулярно-генетические методы в диагностике нейробластомы» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. Диссертация Строгановой Анны Михайловны полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335 и от 02 августа 2016 года №748), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология.


Рецензент:

**Заслуженный врач Российской Федерации,
заведующий кафедрой патологической анатомии
ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова
Минздрава России,
доктор мед. наук, профессор
Телефон: +7 (903) 184-92-17
E-mail: ovzair@mail.ru**


Зайратьянц Олег Вадимович
25.01.19

Дата: «17» января 2019 г.

Подпись профессора Зайратьянца Олега Вадимовича удостоверяю:

**Ученый секретарь МГМСУ им. А.И.Евдокимова,
Заслуженный врач Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор** 
Васюк Юрий Александрович

ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, адрес: 127473,
г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1.
Телефон: 8 (495) 684-32-72
E-mail: 241K@mail.ru