

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, Хохловой Светланы Викторовны на диссертационную работу Уткина Дмитрия Олеговича «**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАННЫХ ГЕНОВ МИКРОРНК И РАСТВОРИМЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ**», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.6. – онкология, лучевая терапия : П.2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.); П.3. Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики онкологических заболеваний.

Актуальность проблемы и её связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельности

Актуальность выбранной темы не вызывает сомнений и обусловлена тем, что рак яичников характеризуется быстрым ростом, ранним метастазированием и отсутствием патогноматичных признаков болезни на ранних стадиях, что и приводит к приходу к онкологу пациентов уже на распространенных стадиях процесса. Поэтому на сегодня придается большое значение как можно раннему выявлению значимых диагностических и прогностических маркеров рака яичников. Известно, что в развитии и метастазировании РЯ играют большую роль регуляторные микроРНК, которые могут как подавлять экспрессию многих онкогенов, так и стимулировать. В литературе сегодня опубликованы целый ряд статей, доказывающих, что гиперметилованные некоторые микроРНК могут выключать гены, отвечающие за возникновение рака и его метастазирование. И определению и выявлению этих микроРНК посвящено огромное количество

работ, потому что они могут служить высокоспецифичными и чувствительными диагностическими и прогностическими маркерами, которые могут быть включены в тест-систему для скрининговой программы РЯ и служить прогнозированию лечения данной патологии. То, что данное направление является очень актуальным говорят число публикаций, возрастающих с каждым годом.

Пока в клинических исследованиях ингибиторы контрольных точек иммунного ответа - PD-1/PD-L1 не показали свою эффективность при РЯ, хотя по данным литературы их экспрессия составляет около 70-80% и некоторые работы докладывают о корреляции экспрессии PD-1/PD-L1 с рядом клинических факторов, что также говорит о дальнейших исследованиях в этом направлении. Пока не определен значимый уровень экспрессии PD-1/PD-L1 при РЯ и клинические факторы, которые четко и достоверно коррелируют с экспрессией. На сегодня также данная тема очень активно обсуждается и многие авторы ищут причины не эффективности иммунотерапии и возможности ее правильного применения в лечении РЯ. А работ, посвященных связи контрольных точек иммунитета у больных РЯ с экспрессией генов микроРНК крайне мало и совсем не изучена их связь с маркерами гиперметилирования генов микроРНК

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в работе

В работе Уткина Д.О. В продемонстрированы статистически значимые отличия концентраций рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови здоровых женщин и больных любыми онкологическими заболеваниями (доброкачественные, пограничные и злокачественные), что может помочь в скрининге РЯ. Концентрация sPD-L1 высокосignificantly была выше при наличии асцита и опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, напрямую коррелировала с уровнями опухолевых маркеров СА-125 и HE-4 в крови, но не

было связи с концентрациями рецептора sPD-1. У больных РЯ показана корреляция гиперметилирования 3-х генов (*MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*) с прогрессированием РЯ и со стадией процесса. Доказана связь метилирования для 9 генов микроРНК в опухолях больных РЯ со стадией; для 6– с наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR132* – с диссеминацией по брюшине; гена *MIR-375* – со снижением степени дифференцировки новообразования. Впервые показано, что уровни метилирования 5 генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) в опухоли достоверно связаны с высокой концентрацией sPD-L1 в плазме крови больных РЯ, и выявлен наиболее значимый ген *MIR-124a-2*., изучение которого дальше нужно продолжить. В Многофакторном анализе продемонстрирована достоверная связь уровня sPD-1 с плохим прогнозом РЯ.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Диссертационная работа Уткина Дмитрия Олеговича конечно же высоко научна, которая задает вектор для продолжения начатых исследований. По поводу ряда клинических факторов ,т.к стадия, оптимальность операции, уровни маркеров, мы уже имеем четкое представление о связи с прогнозом заболевания, а вот данные, полученные автором в многофакторном анализе выявили новый для клиницистов маркер- это числовой уровень sPD-1, который четко коррелировал с плохим прогнозом при РЯ. Впервые автор доказал связь числового исходного уровни sPD-1 и его лиганд sPD-L1 в плазме крови больных РЯ с основными клинико-морфологическими характеристиками опухоли, что также позволит использовать эти показатели с целью оценки прогноза заболевания.

Очень важной частью работы было определение и значимого уровня концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл и sPD-L1 более 22 пг/мл, и

наличие метилирования 3 генов микроРНК (*MIR-9-1*, *MIR-124a-2*, *MIR-34*) в опухоли, что было связано с статистически значимо низкой 3-летней безрецидивной выживаемостью больных РЯ.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа изложена на 169 страницах, состоит из введения, 5 глав (обзор литературы, материалы и методы, собственные результаты, заключение и обсуждение собственных результатов), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа проиллюстрирована 62 таблицами и 233 рисунками. Список литературы включает 15 отечественных и 188 зарубежных источника. Во введении обосновывается актуальность, сформулированы цель и задачи исследования.

В обзоре литературы анализируются имеющиеся на сегодняшний день сведения о роли микроРНК в патогенезе, метастазировании рака яичников, о вариантах микроРНК и их роли каждого этапа развития РЯ и самой важной роли метилирования микроРНК. Обсуждается изучение растворимых форм рецептора PD-1 (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1) и роли данных рецепторов при РЯ. На мой взгляд много внимания уделять классификации РЯ не следует, а вот более подробно следовало бы осветить исследования иммунотерапии при РЯ.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования. Всего в исследование вошло 93 женщины, больных РЯ, 10 женщин с пограничными опухолями яичников и 22 больные с доброкачественными опухолями яичников, проходившими обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

В качестве группы контроля взято 35 практически здоровых женщин. Не указано за какой период времени взяты пациенты. Проанализирована клинкоморфологическая характеристика больных. Не вижу большого смысла анализировать число родов, выкидышей, наличие сопутствующей патологии.

Учитывая, что группа мала, не вижу смысла распределять пациентов на наличие мтс в б.сальник до 2 см, до 5 см. Пациенты грамотно распределены в подгруппы по виду гистологии, по степени дифференцировки, по виду проведенной ХТ 1-ой линии. Анализ опухолевых маркеров СА-125 и НЕ-4 проводился на автоматическом электрохемилюминесцентном анализаторе (COBAS E601, фирма ROCHE, Швейцария). Молекулярно-генетические исследования. Выбор микроРНК, ассоциированных с раком яичников, производили на основании анализа базы данных интернет-ресурса miRWalk2.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>). Затем проводили анализ на наличие CpG островков по базе данных Epigenomics (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани яичников по стандартному фенол-хлороформному методу. Выделенная ДНК хранилась при температуре -20°C. Спектрофотометром NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США) контролировали качество и концентрацию ДНК. Анализ метилирования генов микроРНК проводился методом МС-ПЦР с детекцией в реальном времени. Тотальная РНК выделяли с помощью метода гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции. Концентрацию нуклеиновых кислот оценивали по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, США). Экспрессии генов микроРНК проводились методом TaqMan МС-ПЦР. Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 измеряли в образцах плазмы крови здоровых доноров и больных РЯ, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью реактивов прямого иммуноферментного анализа Human PD-L1 Platinum ELISA и Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США) согласно инструкциям производителя. Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA» и SPSS.

Глава 3 посвящена собственным результатам автора. Содержание маркера sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови больных опухолями яичников разных групп и в контроле. На мой взгляд надо было сравнить рак яичников с группой контроля по всем показателям. Отдельный анализ пограничных и

доброкачественных опухолей не несет смысловую нагрузку, либо нужно было объединить доброкачественные и пограничные опухоли для анализа. Доказано, что у больных опухолями яичников высокий уровень sPD-1 более 65 пг/мл может служить маркером дифференцирующим злокачественную опухоль от нормы. Те выявлен маркер для скрининга. Соотношение sPD-1/sPD-L1 не обладало информативностью для разделения групп больных и контроля. Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ не показали связь с возрастом. Не выявлена связь с репродуктивным здоровьем, числом выкидышей и родов. Этот анализ не несет смысловой нагрузки. Отмечена связь концентрации sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ с увеличением распространенности процесса ($p=0,15$). Уровень sPD-L1 у больных РЯ с Ic стадией был достоверно ниже, чем у больных РЯ с IIIc стадией ($p=0,04$) и особенно по сравнению с группой пациенток с IV стадией опухолевого процесса ($p=0,005$). Для сравнения лучше было бы объединить группу с 1-2 стадиями и 3-4 стадиями. Таким образом, в многочисленных поданализах показано, что концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников увеличиваются с ростом распространенности опухолевого процесса. Концентрации как sPD-1, так и sPD-L1 в зависимости от гистотипа и степени дифференцировки различий не выявило. На мой взгляд следовало в анализе объединить группы с low и high grade опухолями и серозные и другие опухоли. Далее проведен подробный анализ связи маркеров с размерами очагов в сальнике, асцитом и связь с уровнями маркеров СА-126 и HE4. Есть в тексте выводы по многофакторному анализу, но я не увидела сам анализ (какие факторы были включены сначала в однофакторный анализ и далее в многофакторный).

Глава 4 посвящена изучению метилирования генов микроРНК. Глава 3 посвящена собственным данным, значит нужно и 4 и 5 главы сделать подглавами 3 главы. В начале выявили 14 генов микроРНК в ткани опухоли яичников и далее выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в

первичной опухоли и наблюдали дальнейшее повышение уровня метилирования ряда генов микроРНК в метастазах РЯ. В результате анализа определены гиперметилированные 3 гена микроРНК, которые ассоциировались с процессом возникновения/развития РЯ на начальных стадиях. Т.е. эти гены можно применять как диагностический маркер. В данном разделе анализировалась и конкордантность метилирования и в первичной опухоли и в метастазах, связи с возрастом и маркерами и выявлена связь с маркером СА-125. Проведен подробный анализ связи метилирования маркеров микроРНК в тканях больных раком яичников с клиническими факторами заболевания. Уровни метилирования генов микроРНК повышались по мере распространенности опухолевого процесса. Доказано, что медианы уровней метилирования генов в опухоли больных РЯ большинства изучаемых микроРНК были выше в группе с наличием метастазов в большом сальнике, а связи с асцитом не было. В опухолях яичников чаще выявляли большие уровни метилирования генов микроРНК при G3, и один только ген *MIR-375* показал значимо различающиеся медианы при умеренной (10,9%) и низкой (21%) степени дифференцировки новообразования, а в ткани метастазов, напротив, при G3 чаще выявляли меньшие уровни метилирования генов микроРНК. На мой взгляд очень интересная подглава посвященная связи показателей метилирования и экспрессии генов микроРНК с концентрациями плазменных маркеров sPD-1 и sPD-L1 у больных раком яичников и не показано статистически значимой связи экспрессии генов микроРНК с концентрациями sPD-1 и sPD-L1. Не было выявлено значимой связи уровней экспрессии генов микроРНК с повышением клинической стадией, но выявлено статистически значимое различие уровней экспрессии гена микроРНК *MIR-339* в ткани опухоли у больных с наличием и отсутствием метастазов в большом сальнике ($p < 0,05$). Это очень интересные данные, которые можно использовать для дальнейшего изучения.

Глава 5 отдаленные результаты лечения больных. Нужно ввести как подглаву к 3 главе (собственные данные). Замечание по формулировкам: безрецидивная выживаемость термин применяется только для начальных стадий и без наличия остаточных опухолей, при распространенных стадиях применяется термин выживаемость без прогрессирования. Такое же замечание как ранее, нужно другое объединение пациентов для анализа. Зачем анализировать по размеру мтс в б.сальник, по наличию абортот и выкидышей. Если есть анализ от полноты циторедукции, зачем от наличия резидуальной опухоли (это одно и то же). В многофакторном анализе выявлен только один фактор неблагоприятного прогноза-это стадия, а степень дифференцировки нет. Но нужно объединить умеренную степень с низкодифференцированной и тогда все получится. При оценки выживаемости без прогрессирования в зависимости от концентрации sPD-1 и sPD-L1 проведен анализ по квартил- он лишний, когда есть пороговое значение. И при анализе в зависимости от порогового значения установлена статистически значимая связь показателей выживаемости без прогрессирования с концентрациями sPD-1, sPD-L1 в плазме крови больных ЗОЯ до лечения. И при связи уровней метилирования микроРНК с показателями ВБП обнаружены статистически значимые различия ВБП с разным уровнем метилирования для 3-х генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9*. Таким образом автором доказано: концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл статистически значимо снижали ВБП больных ЗОЯ, концентрации sPD-L1 в плазме крови более 22 пг/мл статистически значимо снижали ВБП больных ЗОЯ, уровни метилирования микроРНК *MIR-9-1* (снижение на 54,2%), микроРНК *MIR-124a-2* (снижение на 46,1%) статистически значимо снижали ВБП больных ЗОЯ, многофакторный анализ показал, что статистически значимо определяли ВБП больных ЗОЯ только стадия заболевания и концентрации маркера sPD-1, которые можно считать независимыми факторами прогноза при раке яичников.

В **заключении** автор обобщил и проанализировал полученные результаты исследования, сопоставил их с данными литературы.

Выводы следуют из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам. Практические рекомендации конкретны.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на научных региональных, всероссийских и международных съездах и конференциях.

Материалы диссертационного исследования изложены в 13 научных публикациях.

Автореферат полностью отражает содержание работы, хорошо иллюстрирован.

Заключение. Диссертационная работа Уткина Дмитрия Олеговича «**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАННЫХ ГЕНОВ МИКРОРНК И РАСТВОРИМЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1 ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ**» квалификационное исследование, в котором решена научная проблема – выявлен новый для клиницистов маркер- это числовой уровень sPD-1, который может служить скрининговым маркером для выявления РЯ, выявлены уровни метилирования микроРНК 3 генов, определяющие прогноз РЯ. Основные положения диссертационной работы представлены в публикациях и автореферате. Результаты исследования и сформулированные на их основе выводы свидетельствуют о научной новизне и практической значимости работы.

По актуальности, новизне полученных результатов, научной и практической значимости диссертационная работа соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 года №426, от 11 сентября

2021 г. №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Уткин Д.О заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Даю согласие на сбор, обработку, хранение и передачу персональных данных в диссертационный совет 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук,
Заведующая онкологическим отделением противоопухолевой
лекарственной терапии Института онкогинекологии и маммологии ФГБУ
«Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»
(14.01.12 – Онкология)

Хохлова С.В.

04.10.23г.

Подпись д.м.н., Хохловой С.В. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ АГП
им. В.И. Кулакова» Минздрава России
кандидат медицинских наук, доцент

Адрес: г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Тел.: +7 495 531-44-44

E-mail: info@oparina4.ru



Павлович С.В.