

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о научно-практической значимости диссертационной работы

Бабышкиной Наталии Николаевны

«Прогностическая и предсказательная значимость молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR- сигнальным путем при раке молочной железы», представленной к защите на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Н.Н. Бабышкиной посвящена важному направлению в онкологии – исследованию опухолей молочной железы с различными молекулярно-генетическими и биохимическими характеристиками в контексте лекарственной чувствительности и выживаемости пациентов с такими опухолями.

В сферу интересов автора вошел белок фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K), находящийся на пересечении внутриклеточных сигнальных путей и контролирующей важнейшие функции клеток. На сегодняшний день участие многочисленных эффекторов и модуляторов PI3K в регуляции устойчивости опухолевых клеток с разными биологическими характеристиками к действию цитостатиков и антиэстрогенов изучено явно недостаточно. В своем исследовании автор предлагает новый комплексный подход к раскрытию механизмов лекарственной устойчивости злокачественных опухолей молочной железы и поиску значимых в плане эффективности лечения биомаркеров посредством генотипирования, анализа экспрессионной активности генов и их белковых продуктов ряда ключевых звеньев PI3K сигнального пути.

Результаты представленной работы могут быть полезны как для понимания молекулярных механизмов канцерогенеза, так и для разработки перспективных биомаркеров

таргетной терапии рака молочной железы, что свидетельствует о современности и актуальности исследования.

Научная новизна

Интеграция результатов генотипирования компонентов сигнального пути PI3K, анализа экспрессионного статуса генов и белков, кодируемых этими генами, позволила выделить ключевые молекулы, потенциально связанные с люминальными подтипами рака молочной железы и трижды негативными опухолями, а также определить компоненты PI3K пути, ассоциированные с особенностями клинических проявлений биологических подтипов рака молочной железы.

Важным и новым результатом исследования является факт выявления различной чувствительности люминальных подтипов рака молочной железы к гормональному препарату тамоксифен в зависимости от генетического статуса (наличие точечных замен в генах *KDR*, *ESR1*, *TGF- β RI*, *IGFR1*, *EGFR*), что может определять уровень экспрессии матричной РНК и активность кодируемых ими белков.

Кроме того, автором впервые показана возможность использования генетических и белковых факторов (мутантные генотипы *ESR1* rs2228480, высокий уровень экспрессии EGFR- и AktpS473 белков, гетерогенный характер распределения ER α в опухоли), а также их уникальных комбинаций для оценки исхода заболевания у больных люминальным раком молочной железы.

Впервые определена маркерная роль эффекторов PI3K – рецепторов факторов роста VEGFR2 и EGFR – в качестве предикторов, позволяющих в процессе предоперационной терапии предсказывать лечебный ответ у больных трижды негативным раком молочной железы. Выявлена взаимосвязь экспрессии белков VEGFR2 и EGFR с отдаленными результатами лечения данной группы больных, что свидетельствует об их высокой прогностической значимости.

Полученные в работе новые факты раскрывают вероятные молекулярные механизмы изменения активности PI3K сигнального пути, специфичные для разных биологических подтипов рака молочной железы, что формирует лекарственную устойчивость или эффективный ответ опухоли на терапию.

Практическая значимость работы

Результаты диссертационного исследования значительно расширяют представления о процессах формирования резистентности к адъювантной гормональной терапии тамоксифеном и обосновывают новые стратегии ее назначения в зависимости от подтипа опухоли с учетом генетических (полиморфизм гена эстрогенового рецептора) и белковых факторов (распределение в опухоли эстрогеновых рецепторов, уровень экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста).

Получены новые данные о закономерностях формирования лекарственной устойчивости к химиопрепаратам. Выявлены новые предиктивные маркеры (прежде всего VEGFR2), которые наряду с классическими клинико-морфологическими параметрами дают возможность в процессе предоперационной химиотерапии оценить ее эффективность и тем самым, избежать проведения высокотоксичного лечения у ряда больных.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Представленная работа выполнена с достаточным объемом фактического материала для получения достоверных результатов. Было обследовано 524 пациента с люминальными подтипами рака молочной железы и 101 пациент с трижды негативным фенотипом опухоли. Высокий методический и методологический уровень исследования подтверждается комплексом современных методов молекулярной биологии (генотипирование полиморфных вариантов генов эффекторов PI3K с помощью ПЦР в режиме реального времени, ПЦР с обратной транскрипцией для количественной оценки мРНК данных генов, экспрессионный

профиль исследуемых белков с использованием иммуногистохимии, типирование фенотипов опухолевых клеток с помощью проточной цитометрии). Использование комплекса этих методов на достаточно крупной выборке больных (625 пациентов) позволило получить достоверные и обоснованные данные. В целом, поражает объем проведенных экспериментов по генотипированию, иммуногистохимическим, цитологическим исследованиям, все исследования сопряжены с клиническими наблюдениями пациентов. В работе проделано несколько десятков тысяч аналитических исследований, исследования разумно запланированы, интегрированы, результаты представлены в виде хорошо читаемых таблиц, схем, графиков.

Репрезентативные для анализа выживаемости выборки пациентов, детальный анализ исходов их лечения наряду с адекватными статистическими подходами также свидетельствует о достоверности результатов.

Структура и общая характеристика диссертации

Диссертация Н.Н. Бабышкиной написана хорошим литературным языком, иллюстрирована различными вариантами рисунков и схем, содержит достаточное количество таблиц. Структура диссертации традиционна. Список литературы представлен 405 публикациями, включая 6 отечественных и 399 иностранных авторов.

Первая глава содержит обзор литературы по теме диссертации, в которой дается понятие о биомаркерах рака молочной железы, сформированное с периода открытия гормональных рецепторов до использования прогностических мультипараметрических шкал. Достаточно полно освещены литературные данные о механизмах лекарственной устойчивости опухолей люминального и трижды негативного фенотипа. Дана исчерпывающая информация о сигнальном пути PI3K, включающая характеристику его основных звеньев и особенности реализации активности каскада в опухолях разных

биологических типов. В заключение обзора автором обосновывается необходимость поиска новых подходов для повышения эффективности лечения больных раком молочной железы.

Вторая глава включает дизайн работы, клиническую характеристику групп пациентов, описание методов исследования. Представлены полные протоколы выделения ДНК и РНК из образцов опухоли, протоколы проведения различных типов ПЦР и учета их результатов, описаны этапы проведения иммуногистохимического анализа и фенотипирования опухолевых клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Статистическая обработка результатов исследования выполнена на современном уровне с использованием целого ряда пакетов прикладных программ SPSS 21.0; Statistica 6.1 и программы R 3.4.2.

Третья глава результатов собственного исследования и их обсуждения посвящена изучению особенностей ключевых звеньев сигнального пути PI3K в опухолях молочной железы люминального и трижды негативного типов. Автором показан специфический профиль генетических вариаций компонентов PI3K сигнального пути, а также определенный характер экспрессии их генов и белков для разных биологических вариантов рака молочной железы. Приоритетные данные были получены при анализе ассоциаций вариантов компонентов PI3K сигнального пути с эффективностью лечения тамоксифеном. Выявлено, что генетические (полиморфизм гена *ESR1*) и белковые факторы (характер экспрессии эстрогеновых рецепторов) могут быть использованы в качестве маркеров прогноза для люминальных раков; а биологические особенности опухоли (состояние регионарных лимфоузлов) и экспрессионные факторы (статус экспрессии EGFR) – для группы люминального А типа опухолей.

Автором изучена и проанализирована возможность использования компонентов PI3K пути в оценке эффективности предоперационной химиотерапии у больных трижды негативным раком молочной железы. Полученные результаты свидетельствуют о высокой предсказательной значимости для ответа на лечение, прежде всего, белковых факторов

(статус экспрессии VEGFR2 в опухоли до химиотерапии) наряду с возрастными особенностями пациенток.

Автором определена роль разработанного комплексного подхода в качестве полезного инструмента поиска биомаркеров, определяющих эффективность лекарственной терапии разных биологических типов рака молочной железы, предложены схемы вовлечения значимых генетических, транскрипционных и белковых факторов в механизмы активации PI3K. Следует подчеркнуть, что в данной главе автор проводит сопоставление собственных результатов с данными других авторов, что целесообразно как в плане объективной оценки результатов, так и для определения их клинической значимости.

Выводы полностью следуют из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам. На основании полученных в ходе исследования данных сформулированы конкретные практические рекомендации, имеющие большую практическую ценность.

В автореферате отражены все разделы и положения диссертации. Основные результаты исследования широко опубликованы в ведущих отечественных и зарубежных журналах.

Вызывает удивление отсутствие в работе данных по выявлению аллельных вариантов гена *PIK3CA*, по анализу соматических мутаций в этом гене в ассоциации с реакцией на лекарственные препараты, особенно учитывая недавние исследования об обязательном выявлении аллельных вариантов *PIK3CA* при использовании нового таргетного препарата Пикрей (Алпелисиб), выпущенного компанией Новартис.

В работе приведены многочисленные таблицы результатов поиска ассоциаций генетических особенностей пациентов с выживаемостью, реакцией на лекарственные препараты, размером опухолей, возрастом манифестации заболевания. Ряд выявленных закономерностей действительно оказываются статистически значимыми, однако в большинстве приведенных таблиц каждая группа слишком малочисленна для формирования окончательных выводов по клинической значимости ассоциаций. При обсуждении ассоциаций отдельных генетических вариантов было бы вполне уместно сопоставлять

полученные данные по частотам встречаемости отдельных аллельных вариантов с частотами в популяции (например, используя данные базы данных «1000 геномов»).

Данные замечания носят характер дискуссии, ничуть не умаляют научной значимости и ценности работы в целом.

Заключение

Диссертационная работа Н.Н. Бабышкиной «Прогностическая и предсказательная значимость молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с PI3K/Akt/mTOR-сигнальным путем при раке молочной железы», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача, направленная на оптимизацию лечения больных раком молочной железы с разными биологическими типами на основе выявления биомаркеров прогноза и предсказания.

По актуальности, новизне полученных результатов, научной и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 с изменениями и дополнениями от 21 апреля 2016 года № 335, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Бабышкина Н.Н. заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12-онкология.

Официальный оппонент:

Руководитель лаборатории молекулярной генетики

Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

д.б.н.

тел. +7 905 952 1411

e-mail sp_kovalenko@yahoo.com

С.П. Коваленко

Подпись д.б.н. С.П. Коваленко заверяю

Ученый секретарь

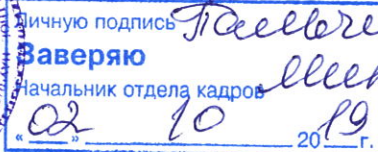
Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

д.б.н.

Н.А. Пальчикова



Коваленко С.П.
Пальчикова Н.А.
Иванова А.М.

Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

630117, Российская Федерация, г. Новосибирск,

ул. Тимакова, дом 2

Тел. +7 (383) 335-98-47

email: csem@centercem.ru