

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора медицинских наук, доцента Титова Константина Сергеевича на диссертационную работу Новиковой Инны Арнольдовны «Биологическая роль и прогностическая значимость клеточных и молекулярных характеристик рака ободочной кишки» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Актуальность темы диссертационной работы

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых наиболее распространенных злокачественных новообразований во всем мире и в РФ, является одной из ведущих причин смерти от рака в мире, ежегодно регистрируется почти два миллиона новых случаев.

За последние три десятилетия достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных основ КРР. Развитие методов геномного анализа позволило выявить генетические патогенетические изменения данного заболевания. Молекулярные исследования также помогли определить межопухолевую и внутриопухолевую клональную/мутационную гетерогенность КРР и частично прояснили механизмы, участвующие в приобретении метастатической активности опухолевых клеток. Были идентифицированы и охарактеризованы опухолевые стволовые клетки (ОСК) при КРР, способные инициировать и поддерживать прогрессию, определяющие устойчивость к стандартным лекарственной и лучевой терапии.

На сегодняшний день уже известно, что взаимодействия между опухолевыми и стромальными клетками определяют исход прогрессирования КРР. Во многих случаях метастазирование начинается уже на ранней стадии опухолевого процесса и данный процесс с поражением отдаленных органов во многом зависит от способности опухолевой клетки взаимодействовать с ее микроокружением. Активация иммунных клеток микроокружения рака толстой кишки представляет собой событие, способствующее установлению про- или противоопухолевого иммунного ответа.

Снижение уровня смертности от КРР является серьезной задачей для систем здравоохранения во всем мире. Несмотря на улучшение знаний о канцерогенезе и понимания причин прогрессии КРР, практические результаты показывают относительно скромный прогресс. В связи с ограниченной

эффективностью используемых в настоящее время классических онкомаркеров, несмотря на социальную и медицинскую осведомленность о КРР, а также расширение программ скрининга, по-прежнему существует острая необходимость в поиске новых диагностических и прогностических инструментов.

Таким образом, изучение биологических свойств опухоли и ее микроокружения, его связи с прогрессированием КРР, является необходимым и актуальным для выбора оптимального подхода к лечению и наблюдению за пациентами, а также поиска дополнительных факторов риска неблагоприятного течения заболевания, позволяющих стратифицировать пациентов с учетом ожидаемого прогрессирования. Кроме того, идентификация клеточных и молекулярных характеристик опухоли представляет первостепенный интерес, поскольку может привести к разработке новых лечебных стратегий при КРР.

Научная новизна диссертационного исследования

Автором впервые проведена оценка уровня циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) у больных раком ободочной кишки и установлены статистически значимые связи с некоторыми клинико-морфологическими факторами прогноза.

Также впервые изучена экспрессия маркеров опухолевых стволовых клеток (ОСК) и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в опухоли при раке толстой кишки в зависимости от некоторых известных клинико-морфологических факторов. Показана статистически значимая связь всех исследованных маркеров (CD44, CD133, ALDH1, ZEB1) со стадией заболевания, степенью выраженности лимфоцитарной инфильтрации, уровнем инвазии опухоли и наличием отдаленных метастазов. Наиболее часто клинико-морфологические факторы прогноза продемонстрировали статистически значимую связь с экспрессией CD44.

Автором впервые проведена комплексная оценка факторов системного и местного иммунитета при различном качественном и количественном содержании ОСК и ЦОК. В микроокружении опухоли показана наибольшая значимость ОСК, коэкспрессирующих CD44+CD133+ рецепторы, для развития местной иммуносупрессии. Исследования на системном уровне впервые показали, что наличие ЦОК у больных раком ободочной кишки вне зависимости от стадии опухолевого процесса сопровождается угнетением

противоопухолевых свойств клеток врожденного (NK-клеток и фагоцитов) и адаптивного иммунитета (Т-лимфоциты), а также цитокиновым дисбалансом.

Также был изучен профиль транскрипционной активности микроРНК в опухоли и ЦОК. Наибольшее отклонение экспрессии микроРНК от нормальных показателей выявлено у больных IV стадии. Впервые показаны однонаправленные изменения экспрессии микроРНК в ЦОК в сравнении с экспрессией микроРНК в опухолевой ткани, отличающиеся по экспрессии только hsa-miR-26a-5p, которая в опухолях различных стадий снижена практически до одинакового уровня, а в ЦОК значимо отличается при регионарном и отдаленном метастазировании.

На основании результатов биоинформационного анализа было установлено участие выявленного паттерна микроРНК в сигналинге эпителиально-мезенхимального перехода и сигнальной сети опухолевых стволовых клеток. Кроме того, автором изучен уровень экспрессии генов-мишеней в опухолевой ткани больных раком ободочной кишки при различной распространенности процесса.

В прикладном аспекте автором впервые проанализирована значимость изученных клеточных и молекулярных характеристик опухоли и ее микроокружения для оценки общей выживаемости и риска метастазирования. По итогам регрессионного анализа были разработаны модели прогноза развития летального исхода заболевания, риска и сроков развития отдаленного метастазирования, что подтверждено патентами РФ.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты диссертационного исследования имеют несомненную научную и практическую. Поскольку данное исследование позволило расширить представления о дополнительных изменениях, происходящих на молекулярно-генетическом, клеточном, тканевом и системном уровне у больных при различном клиническом проявлении и распространенности рака ободочной кишки. В работе показана клиническая значимость ЦОК и ОСК и их микроокружения при II-IV стадиях рака ободочной кишки с различными исходами заболевания. Выявленные изменения на молекулярно-генетическом уровне позволили определить их значимость для оценки общей выживаемости и риска метастазирования у больных раком ободочной кишки. Изученные клеточные и молекулярные характеристики опухоли могут быть использованы

для стратификации пациентов на группы риска и определения индивидуальной тактики лечения и дальнейшего наблюдения.

Практическая значимость работы подтверждена патентными разработками. Автором разработаны прогностические алгоритмы и способы прогнозирования риска летального исхода и метастазирования рака ободочной кишки, а также, срока развития отдаленного метастазирования.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Новиковой И.А. обусловлена актуальностью проводимых исследований, корректно сформулированной целью работы и постановкой адекватных задач.

В ходе исследования автором проанализирован значительный клинический материал, включающий данные о результатах исследования 351 больного раком ободочной кишки II-IV стадий и периоде наблюдения за ними, что позволило обосновать выдвинутые им научные положения и выводы. Автором корректно представлен дизайн исследования.

Материалом исследования являлись: периферическая кровь больных, парафиновые блоки опухолевой ткани, свежемороженая опухолевая и нормальная ткани толстой кишки, изолированные циркулирующие опухолевые клетки. В работе диссертантом использованы современные иммунологические, иммуногистохимические, молекулярно-генетические методы исследования опухоли и изолированных ЦОК (проточная цитометрия, иммуноферментный анализ, детекция и сепарация ЦОК с использованием системы Veridex CellSearch, иммуногистохимический метод, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, биоинформационный анализ данных с использованием баз данных miRBase/mirGeneDB, miRecords, miRTarBase, TarBase, BioCarta и Gene Ontology).

Все полученные результаты подвергнуты анализу с применением методов многомерной статистической обработки, применением современных компьютерных программ. Положения, выносимые на защиту, вытекают из большого массива полученных результатов и отражают все находки, полученные в ходе выполнения исследования. Предложенные автором выводы строго аргументированы. Каждый вывод обоснован, логично вытекает из содержания работы, соответствует поставленной цели диссертации.

По теме диссертации опубликовано 48 печатных работ, из них 12 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора медицинских наук, из которых 5 – в изданиях международной реферативной базы данных и системы цитирования, а также получено 2 патента на изобретение Российской Федерации.

Результаты диссертационной работы представлены на российских и зарубежных конференциях.

Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом

Диссертационная работа построена по традиционному плану, изложена на 346 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 615 источников, в том числе 47 отечественных и 568 зарубежных. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 97 таблицами, а также 5 клиническими примерами.

Во введении обоснована актуальность выбранного направления исследования. Цели и задачи сформулированы четко. Научная новизна и практическая значимость не вызывают сомнений. Положения, выносимые на защиту, четко и конкретно сформулированы, что дает возможность судить о значимости работы.

В 1 главе «Обзор литературы» отражены современные представления о молекулярно-биологических и иммунологических характеристиках КРР, уделяя внимание вопросам, связанным с клинко-эпидемиологическими особенностями, молекулярно-генетическими характеристиками, механизмами прогрессирования опухоли и моделями метастазирования, ОСК и эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП), как одним из основных этапов, способствующих инвазии и внутрисосудистой циркуляции опухолевых клеток, роли ЦОК в макрометастазировании, вопросам, связанным с системными и локальными иммунологическими изменениями.

В главе 2 приведена характеристика клинического материала и методов исследования. Проанализированные данные о 351 больном раком ободочной кишки II стадии заболевания (T3-4N0M0) с наличием неблагоприятных факторов прогноза (низкая степень дифференцировки, лимфоваскулярная/периневральная инвазия), III стадии (T1-4N1-2M0), IV

стадии (T1-4N0-2M1a). Автором представлен дизайн исследования, определены критерии включения и исключения пациентов, представлена характеристика больных по основным критериям, подробно представлены методики иммунологического исследования опухоли и периферической крови методом проточной цитометрии и ИФА, детекции и сепарации циркулирующих опухолевых клеток, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований, методы статистической обработки результатов.

В главе 3 представлены данные о частоте выявления ЦОК у больных раком ободочной кишки и их связь со стандартными клинικο-морфологическими факторами прогноза, а также влияние мутации в гене KRAS и уровня ЦОК на прогрессирование опухоли. Показано сопряжение наличия ЦОК, их количества со стадией заболевания, с уровнем прорастания опухоли в стенку кишки и подлежащие ткани, наличием метастатического поражения регионарных лимфоузлов и печени, степенью дифференцировки опухоли, наличием лимфоваскулярной инвазии и слабой лимфоцитарной инфильтрации. Выявлена связь повышенного уровня ЦОК и раннего метастазирования при наличии в опухоли мутации гена KRAS и содержании ЦОК более 5. Глава иллюстрирована рисунками, таблицами и клиническими примерами.

В главе 4 представлена подробная характеристика показателей системного иммунитета при наличии и отсутствии ЦОК. Анализируются показатели врожденного иммунитета (CD16+56+, НК Т-лимфоциты, CD335+, CD16dim56bright, CD16+56dim, Granzyme B, Perforin, фагоцитарное звено) и адаптивного системного иммунитета (Т-хелперно-индукторного, Т-цитотоксического звеньев, Т-клеток памяти и наивных Т-лимфоцитов), уровень сывороточных цитокинов. Выявленные различия позволили автору оценить часть из них как более неблагоприятные факторы при наличии ЦОК, что может способствовать их выживанию и диссеминации.

В главе 5 проведен анализ экспрессии маркеров ОСК и ЭМП в ткани опухоли ободочной кишки в зависимости от клинικο-морфологических показателей опухоли и при различном уровне ЦОК. Автором показано сопряжение всех исследуемых маркеров в зависимости от стадии заболевания, степени выраженности лимфоцитарной инфильтрации, уровня инвазии опухоли и наличия отдаленных метастазов, количества ЦОК в периферической крови и отсутствие различий в зависимости от локализации опухоли. Глава проиллюстрирована таблицами и рисунками.

В главе 6 представлен анализ показателей местного иммунитета и иммунофенотипических характеристик опухолевых клеток, а именно, маркеров ОСК и их коэкспрессии, экспрессии МНС 1 класса и PD-L1 при наличии и отсутствии отдаленных метастазов. Интересным представляется то, что более выраженные изменения в микроокружении опухоли выявлены при коэкспрессии маркеров ОСК CD44+ и CD133+, чем при экспрессии только одного маркера на опухолевых клетках. Так, наличие ОСК, коэкспрессирующих CD44+CD133+, сопровождается изменением в опухоли процессов распознавания, клеточной гибели, как опухолевых клеток, так и лимфоцитов, нарастанием локальной иммуносупрессии и повышением уровня Т-регуляторных клеток. Полученные автором результаты могут представлять интерес при определении показаний для назначения иммунотерапии ингибиторами контрольных точек.

В главе 7 автором проанализирован профиль транскрипционной активности микроРНК в опухолях и в ЦОК, а также их генов-мишеней у больных раком ободочной кишки II-IV стадий. При всех стадиях заболевания характерным оказалась гиперэкспрессия miR-126-5p и miR-92a-3p в опухолевой ткани и снижение экспрессии miR-26-5p. Сравнение профиля экспрессии микроРНК в опухолевой ткани и ЦОК показало однонаправленность изменений. Представленные в данной главе результаты биоинформационного анализа участия микроРНК в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода и потенциала ОСК позволяют предполагать единство их происхождения. Автором был также оценен профиль экспрессии генов, являющихся ключевыми участниками сигнальных путей эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и стволовых клеток опухоли (Wnt, Hedgehog, NF- κ B) в опухоли при различных стадиях.

В главе 8 дается комплексная оценка влияния ЦОК, ОСК, их молекулярно-генетических характеристик, системных и локальных иммунологических факторов на выживаемость больных раком ободочной кишки. Для оценки прогностической значимости исследованных факторов проведен регрессионный анализ Кокса.

Отобраны наиболее значимые показатели для оценки общей выживаемости и риска метастазирования. По итогам регрессионного анализа разработаны модели прогноза развития летального исхода заболевания, риска и сроков развития отдаленного метастазирования. Прикладное значение разработанных автором моделей наглядно продемонстрировано клиническими примерами.

В заключении содержится тщательный анализ собственных полученных результатов в сравнении с данными отечественных и зарубежных исследований.

Выводы диссертации логически вытекают из результатов исследования и полностью соответствуют определенной цели и сформулированным задачам. На основании полученных результатов автором даны практические рекомендации.

Список литературы соответствует ссылкам на использованные источники в тексте диссертации.

Автореферат отражает основные положения диссертации, хорошо иллюстрирован, оформлен в соответствии с регламентирующими документами. Диссертация выполнена и написана с большим научным интересом к проблеме, с высоким профессионализмом и скрупулезностью.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Полученные в диссертационной работе результаты имеют несомненную научную и практическую ценность. Выявленные автором изменения в опухоли и ее микроокружении, происходящие на различных уровнях, вносят дополнительный вклад в разработку фундаментальной концепции метастазирования при раке ободочной кишки. Каждый из этих факторов потенциально и в перспективе может представлять мишень для противоопухолевой лекарственной терапии.

Полученные автором результаты могут быть внедрены в работу онкологических учреждений России с целью стратификации пациентов раком ободочной кишки на группы риска и прогнозирования течения заболевания, для индивидуализации лечебной тактики и наблюдения после его завершения.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Выявленные стилистические неточности не влияют на положительную оценку данной работы.

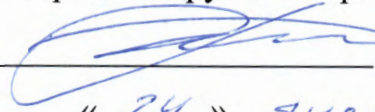
Заключение

Диссертационная работа Новиковой Инны Арнольдовны «Биологическая роль и прогностическая значимость клеточных и молекулярных характеристик рака ободочной кишки», является самостоятельным законченным научным трудом, в котором решена актуальная научная проблема – понимание биологического назначения и клинического значения характеристик опухоли при раке ободочной кишки и ее микроокружения в прогрессировании заболевания.

По актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Новиковой И.А. соответствует всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013г. № 842 (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016г., № 748 от 02.08.2016г., № 1168 от 01.10.2018г., № 1539 от 11.09.2021г.), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а автор заслуживает присуждения ему искомой степени доктора медицинских наук по специальности 3.1.6 – Онкология, лучевая терапия.

Официальный оппонент: профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики имени В.П. Харченко Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»,


доктор медицинских наук, доцент


Титов К.С.
« 24 » Января 2023г.

Подпись доктора медицинских наук, профессора
Титова Константина Сергеевича «заверяю»

Учёный секретарь Ученого совета Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»,

кандидат фармацевтических наук, доцент


Максимова Т.В.

Адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО «РУДН») Тел.: (495) 434-70-27. E-mail: rudn@rudn.ru
Сайт: <https://www.rudn.ru>