

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, заведующего кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, директора Института профессионального образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) Ших Евгении Валерьевны на диссертацию Сорокиной Марии Андреевны «Возможности применения секвенирования нового поколения для оценки биомаркеров ответа и резистентности на противоопухолевую терапию», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Актуальность темы диссертационного исследования

Злокачественные новообразования являются второй по частоте встречаемости причиной смертности как в России, так и во всем мире. На сегодняшний момент общепринятой считается концепция, что причиной онкологии являются патологические события, такие как геномные, хромосомные или генные мутации.

Реализация таких проектов как “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) в параллель с революционными достижениями в технологиях секвенирования ДНК открыла новую, геномную эру в биологии и онкологии. Развитие методов высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) сделало возможным изучать разнообразные типы молекулярно-генетических “портретов” опухоли. Также методы NGS успешно используются для анализа других уровней организации клеточной информации — транскриптома и эпигенома. Анализ больших объемов данных - это одна из самых перспективных стратегий в изучении драйверных генов, ответственных за малигнизацию и прогрессию опухоли, а также профилей экспрессии, ассоциированных с чувствительностью к определенному противоопухолевому препарату.

На данный момент молекулярно-генетические методы широко применяются в онкологии. Однако, несмотря на их растущее признание, зачастую

геномная характеристика опухоли сводится к использованию таргетных панелей, содержащих лишь малую часть онкогенных изменений.

На сегодняшний момент в клинических рекомендациях Минздрава РФ, FDA и ESMO не упомянут метод определения белков-биомаркеров с помощью РНК секвенирования (RNA-seq). Тем не менее, в связи с удешевлением и более широким использованием молекулярно-генетических методов диагностики, встает вопрос о внедрении таких подходов в повседневную клиническую практику. Также, для многих видов солидных неоплазий и лимфом в практических рекомендациях отсутствует четкое указание на прогностическую или предиктивную ценность уже известных биомаркеров, измеренных классической методикой иммуногистохимии (ИГХ).

Интеграция RNA-seq с ИГХ тестированием может свести к минимуму вариабельность оценки ИГХ, особенно в условиях ограниченного количества ткани, что в конечном итоге может помочь в принятии клинических решений и повлиять на эффективность персонализированного лечения онкологических заболеваний. В работе Сорокиной М.А. продемонстрирована статистически значимая связь между RNA-seq и ИГХ для ряда белковых биомаркеров (ER, PR, HER2, PD-L1 и Ki67).

Неходжкинские лимфомы являются крайне гетерогенной группой, зачастую рефрактерных к ритуксимабу и стандартной химиотерапии. Сорокиной М.А. на данных полноэкзомного секвенирования (WES), RNA-seq и бисульфитного секвенирования был проведен ретроспективный поиск биомаркеров на терапии дувелисибом, ромидепсином, бортезомибом, азацитином + СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизолон) и Т лимфоцитами с химерными антигенными рецепторами, которые распознают опухолевый антиген CD19 (CART19) клетками в ходе которого были идентифицированы фармакодинамические и предиктивные биомаркеры, которые, в случае одобрения регулирующих органов, могут использоваться для выявления популяций пациентов, которым будет полезна терапия, а также для клинической диагностики с целью подтверждения эффективности лечения.

Диссертационная работа Сорокиной Марии Андреевны, посвященная изучению конкордантности измерения ключевых клинических биомаркеров с помощью ИГХ и RNA-seq, а также поиску фармакодинамических биомаркеров чувствительности на новые схемы противоопухолевой терапии у пациентов с неходжкинскими лимфомами является актуальной и своевременной.

Степень обоснованности и достоверности научных положений рекомендаций и выводов

Диссертационное исследование спроектировано и организовано на высоком научно-методическом уровне. Достоверность полученных результатов, сформулированных научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается соблюдением в диссертации всех условий доказательности научной работы. Биопсийный материал представлен репрезентативной выборкой состоящей из 4 когорт: светлоклеточный почечно клеточный рак (N=127), ранее нелеченая периферическая Т клеточная лимфома (ПТКЛ, N=17), рефрактерная или рецидивирующая ПТКЛ (N=66) и диффузная В крупноклеточная лимфома (ДВККЛ, N=49). Детальный анализ полученных результатов позволяет утверждать, что выводы и положения диссертации экспериментально обоснованы.

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью современных методов математической статистики, общепринятых в медико-биологических исследованиях, в соответствии с чем, достаточность полученных результатов и сделанных выводов не вызывает сомнений. Все результаты статистического анализа подробно интерпретированы.

Научные положения, выводы и практические рекомендации логически вытекают из содержания диссертации, и представляют наиболее значимые обобщенные результаты исследования. Выводы диссертационной работы полностью соответствуют поставленным задачам.

Научная новизна исследования

Автором доказана конкордантность измерения экспрессии белка PD-L1 с помощью RNA-seq и ИГХ в биоптатах светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР) для последующего использования PD-L1 по данным RNA-seq в качестве предиктивного биомаркера ответа пациентов на терапию блокаторами иммунных контрольных точек (ипилимумаб и ниволумаб).

В диссертационном исследовании на основании данных экзома опухоли впервые проведен биомаркерный анализ у пациентов, получавших пероральный азацитидин в качестве хемосенсибилизации перед СНОР в рамках клинического исследования II фазы терапии первой линии ПТКЛ с превалированием T-fh подтипа, в ходе которого обнаружено, что мутации *TET2* достоверно связаны с ответом на азацитидин + СНОР, а мутации *DNMT3A* с резистентностью. Методом RNA-seq показана повышенная экспрессия генов, связанных с апоптозом и воспалением на фоне приема азацитидина.

В диссертационном исследовании впервые разработаны биомаркеры чувствительности (мутации *TET2*, повышенное содержание В-клеток в биоптате опухоли до начала лечения, повышенная экспрессия сигнатуры экспрессии генов Т-фолликулярных хелперов и фосфоинозитид-3-киназного пути) на монотерапию дувелисибом или его комбинацию с ромидепсином или бортезомибом у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной ПТКЛ в рамках клинического исследования Ib/IIa фазы.

Автором выявлена взаимосвязь типов опухолевого микроокружения (стромального и обогащенного В клетками герминативного центра) с увеличенной общей и безрецидивной выживаемостью пациентов с рефрактерной или рецидивирующей ДВККЛ, получавших CART19 (Аксикабтаген силолейсел, Лизокабтаген маралейсел, Тисагенлеклейсел) в рамках ретроспективного анализа биоптатов методом WES и RNA-seq. В работе выявлены потенциальные биомаркеры чувствительности к терапии CART19: амплификация *PIK3CA* ($p=0.04$) и мутация *CREBBP* ($p=0.03$). Анализ опухолевой клональной эволюции у пациентов с биопсиями до и после лечения смог выявить фармакодинамический

биомаркер устойчивости к аксикабтаген силотейселу (мутация с потерей функции *B2M*), который может быть полезен для оценки эффективности лечения.

Научно- практическая значимость исследования

Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения секвенирования нового поколения для оценки биомаркеров чувствительности и резистентности на противоопухолевую терапию.

В целом, результаты диссертационной работы позволяют расширить новые подходы к персонализации противоопухолевой терапии. Разумное использование биомаркеров сможет повысить процент одобрения онкологических препаратов, которые только начинают клиническую разработку или для которых прорабатываются дополнительные индикации за счет обогащения популяций участников испытаний конкретными молекулярными подтипами, лучше реагирующими на тестируемые методы лечения.

Структура работы

Диссертация имеет традиционную структуру, изложена на 138 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов, состоящей из четырех подразделов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка цитируемой литературы, содержащего 175 источников. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 46 рисунками. Текст диссертации написан хорошим литературным языком, с грамотным применением научной терминологии. Содержание всех разделов соответствует заглавиям и отражает этапы проведения исследования.

В разделе «Введение» в четко структурированном виде сформулирована основная концепция диссертационной работы, определены актуальность, задачи исследования, его научная новизна и значимость.

В главе «Обзор литературы» изложены основные моменты современного представления о применении методов высокопроизводительного секвенирования для поиска биомаркеров резистентности и чувствительности на противоопухолевую терапию. Особо акцентируется внимание на тщательной аналитической и клинической валидации новых методов для применения в реальной

клинической практике. В обзоре рассмотрены также новейшие, но пока не одобренные, терапевтические подходы к лечению неходжкинских лимфом.

В разделе «Материалы и методы» приведен дизайн диссертационного исследования, подробно описаны исследуемые группы пациентов, охарактеризованы примененные методы исследования, включая методы статистической обработки материала. Подробно описаны особенности подготовки биоптатов к секвенированию, ИГХ, основные этапы NGS и программное обеспечение для анализ данных.

Собственные результаты изложены диссертантом в 4 главе, состоящей из четырех разделов. В первом разделе автор демонстрирует положительную корреляцию между экспрессией мРНК PD-L1, определенной с помощью RNA-seq, и классическим обнаружением белка PD-L1 с помощью ИГХ в образцах опухолей скПКР, фиксированных формалином и залитых парафином, что говорит о применимости и конкордантность результатов анализа биомаркеров с помощью ИГХ и методом RNA-seq. Второй раздел посвящен результатам поискового анализа биомаркеров ответа и резистентности на азациитидин в комбинации с СНОР в качестве начальной терапии ПТКЛ в рамках многоцентрового исследования фазы II NCT03542266. В третьем разделе изучаются биомаркеры чувствительности на селективный двойной ингибитор каталитических субъединиц p110 γ и p110 δ фермента фосфоинозитид-3-киназы дувелисибом в качестве монотерапии или в комбинации с высокоселективным обратимым ингибитором активности протеасомы 26S бортезомибом или ингибитором гистондеацетилазы ромидепсином у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной ПТКЛ из клинического исследования NCT02783625. В четвертом разделе выполнена оценка соматических мутаций, нарушений копийности и профиля опухолевого микроокружения с помощью WES и RNA-seq для пациентов с рефрактерной или рецидивирующей ДВККЛ, получавших терапию CART19. Главы хорошо иллюстрированы, материал изложен понятным языком.

В разделе «Заключение» основные результаты диссертационной работы обобщаются и сравниваются с данными литературы. Выводы и практические

рекомендации четко сформулированы и строго аргументированы, логически следуют из результатов и соответствуют поставленным задачам.

В целом диссертационная работа может рассматриваться как полноценно оформленный, законченный научный труд, имеющий несомненное научно-практическое значение.

Автореферат оформлен в соответствии с современным требованиям и отражает основные положения диссертации. Основные положения диссертационной работы М.А. Сорокиной отражены в 9 публикациях, из которых 3 в списке журналов, включенных в международную базу данных SCOPUS и 2 в списке журналов рекомендуемых ВАК Минобрнауки России по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).

Замечания и вопросы по диссертации

Принципиальных замечаний по диссертации не имеется. Стоит отметить небольшой недочет стиля оформления. Данные текста содержат несколько перегруженных иллюстраций, которые сложно воспринять при однократном прочтении. В работе имеются отдельные опечатки.

Сделанные замечания не снижают значимости и качества проведенного исследования и не влияют на общую положительную оценку диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Сорокиной Марии Андреевны на тему «Возможности применения секвенирования нового поколения для оценки биомаркеров ответа и резистентности на противоопухолевую терапию» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи - совершенствование персонализированного подхода к противоопухолевой терапии и предсказание прогноза у пациентов с неходжкинскими лимфомами за счет выявления новых биомаркеров чувствительности на основе NGS.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Сорокиной Марии Андреевны соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (№335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г., №426 от 20.03.2021 г., № 1539 от 11.09.2021 г., №1690 от 26.09.2022 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Директор Института профессионального образования,
заведующий кафедрой клинической фармакологии и
пропедевтики внутренних болезней ФГАОУ ВО
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)
д.м.н., профессор,
шифр научной специальности:
14.00.51 – Восстановительная медицина, спортивная медицина,
курортология и физиотерапия

« 09 » 11 2023 г.  Е. В. Ших

Подпись Е.В. Ших заверяю
ученый секретарь ученого совета ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),
д.м.н., профессор, заслуженный врач Российской Федерации

« 09 » 11 2023 г.  О.Н. Воскресенская

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Адрес организации: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2
Тел.: +7(499) 248-05-53, адрес электронной почты:
rektorat@sechenov.ru, expedition@mma.ru