

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам директора по научной и  
инновационной работе

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России  
член-корреспондент РАН, д.м.н., проф.  
Матвеев Всеволод Борисович



«17» ноября 2023 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) о научно-практической значимости диссертации Сорокиной Марии Андреевны на тему: «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 (медицинские науки).

#### Актуальность темы исследования

За последнее время произошёл качественный скачок в подходах к лечению злокачественных новообразований. Во многом это обусловлено активным внедрением в лечебную практику моноклональных антител, аутологичных CAR T-лимфоцитов, онколитических вирусов, противоопухолевых вакцин, цитокиновой терапии и т.д. Но, не смотря на очевидный прогресс, многие пациенты страдают от жизнеугрожающих побочных эффектов или не отвечают на имеющиеся

линии терапии.

Геномика и транскриптомика опухоли играют ключевую роль в понимании причин эффективности и резистентности разных классов противоопухолевых препаратов. Секвенирование экзома (WES) и транскриптома (RNA-seq) наряду с классической иммуногистохимией (ИГХ) позволяют максимально глубоко проанализировать как опухоль, так и ее микроокружение. Всесторонняя молекулярная характеристика опухоли - это один из способов понимания причин резистентности, а также поиска перспективных биомаркеров токсичности, резистентности и чувствительности на проводимую терапию.

На сегодняшний момент именно ИГХ является золотым стандартом для прогнозирования терапевтического ответа на противоопухолевую терапию. Например, статус биоптата по PD-L1, измеренный методом ИГХ с помощью клинически одобренных антител, используется в качестве биомаркера ответа к ингибиторам иммунных контрольных точек (ICI) для метастатического немелкоклеточного рака легкого, распространенного уротелиального рака и метастатического тройного негативного рака молочной железы. Однако достоверность полученных данных может осложнять длительное хранение парафиновых блоков, использование различных методик интерпретации, антител и значений отсечения для определения позитивности опухоли на PD-L1. Аналогичная ситуация обстоит и с другими важнейшими для клиники маркерами, которые оцениваются методикой ИГХ, такие как ER, PgR, Ki67 и HER.

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

## **Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

## **Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов**

В диссертационной работе Сорокиной М.А. методом RNA-seq впервые определены оптимальные пороговые значения экспрессии для генов *ESR1* (4 TPM), *ERBB2* (8 TPM), *PGR* (2 TPM), *MKI67* (4 TPM) и *CD274* (2.5 TPM), которые согласуются с соответствующими результатами позитивности по ИГХ. Экспрессия PD-L1, измеренная с помощью RNA-seq, точнее предсказывает ответ на ICI, чем ИГХ в когорте пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком (скПКР).

В когорте пациентов с ранее нелеченной периферической Т-клеточной лимфомой (ПТКЛ), принимающих пероральный азациитин в качестве хемосенсибилизации перед СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизолон), обнаружено, что мутации *TET2* достоверно связаны с полным ответом на терапию ( $p=0.007$ ), лучшей выживаемостью без прогрессирования ( $p=0.004$ ) и увеличением общей выживаемости (OS) ( $p=0.015$ ), а мутации *DNMT3A* связаны с уменьшением безрецидивной выживаемости ( $p=0.016$ ).

У пациентов с рефрактерной или рецидивирующей (Р/Р) ПТКЛ мутации *TET2* были связаны с ответом на дувелисиб или комбинацию с ромидепсином или бортезомибом ( $p=0.0036$ ). В работе установлен более высокий уровень экспрессии сигнатур PI3K сигнального пути и Т-фолликулярных хелперов до начала терапии у пациентов чувствительных к дувелисибу или комбинации с ромидепсином или бортезомибом ( $p=0.08$  и

$p < 0.001$ , соответственно).

В работе представлены потенциальные биомаркеры чувствительности к терапии анти CD19 CAR T лимфоцитами (Аксикабтагенсилорлейсел, Лизокабтагенмаралейсел, Тисагенлеклейсел) для пациентов с Р/Р ДВККЛ: 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 потенциальные механизмы устойчивости к аксикабтагенсилорлейселу, таких как мутации в легкой цепи молекулы HLA класса I, что может наделять лимфому способностью избегать эффективного иммунного ответа.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Результаты исследований, проведенных автором диссертации, дополняют и расширяют имеющиеся сведения о персонализированной противораковой фармакотерапии.

На основании полученных данных автор показал обоснованность внедрения в клиническую практику РНК секвенирования для количественной оценки уровня ряда клинически важных биомаркеров (ER, PgR, Ki67, PD-L1 и HER2), что важно, принимая во внимание, тот факт, что наблюдается постепенное снижение стоимости NGS.

Подтверждена связь обогащения фосфоинозитид-3-киназного (PI3K) сигнального пути с чувствительностью к селективному двойному ингибитору каталитических субъединиц p110 $\gamma$  и p110 $\delta$  фермента PI3K (дувелисиб) в качестве монотерапии или в комбинации с ромидепсином или бортезомибом у пациентов с Р/Р ПТКЛ.

Применение на практике схем персонализации противоопухолевой терапии неходжкинских лимфом позволит на основе анализа соматических событий (генетических, эпигенетических и транскриптомных) определить показания к применению той или иной противоопухолевой терапии у конкретного пациента. Назначение более эффективной терапии повышает

выживаемость и качество жизни, а также снижает количество жизнеугрожающих побочных эффектов.

### **Личный вклад автора**

Автором проведен анализ данных литературы по теме диссертационной работы, произведен отбор биоматериала, выполнено планирование и контроль качества всех этапов NGS. Личный вклад автора состоит в выполнении аналитической части диссертационного исследования, автором проведена обработка и интерпретация полученных данных. Автор принимал непосредственное участие в подготовке публикации статей и тезисов докладов. Лично автором написана рукопись диссертации.

### **Достоверность полученных результатов, выводы практических рекомендаций**

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений подтверждается адекватными методами статистического анализа и валидацией части результатов на публичных когортах. Полученные данные свидетельствуют о достижении цели исследования и решении поставленных задач. В диссертационной работе применялись гистологические и иммуногистохимические методы исследования, а также NGS методики (бисульфитное секвенирование с уменьшенной репрезентативностью, секвенирование транскриптома и экзома). Выводы диссертации сформулированы четко и полностью соответствуют задачам исследования.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Результаты проведенного исследования научно обосновали целесообразность применения секвенирования нового поколения для оценки биомаркеров ответа и резистентности на противоопухолевую терапию.

Предложены биомаркеры чувствительности и резистентности к противоопухолевой терапии неходжкинских лимфом на основе данных

экзомаи транскриптома опухоли (мутации *TET2*, *DNMT3A* при назначении азацитидина + СНОР у ПТКЛ; мутации *TET2*, количество В клеток в микроокружении опухоли у пациентов с Р/Р ПТКЛ при назначении дувелисиба в качестве монотерапии или в комбинации с бортезомибом или ромидепсином; амплификация *PIK3CA* и мутация *CREBBP* у Р/Р ДБККЛ при терапии анти CD19 CAR Т лимфоцитами).

Разработаны и внедрены в практическую деятельность химиотерапевтического отделения областного бюджетного учреждения здравоохранения «Ивановский областной онкологический диспансер» 2 биомаркера: таргетное выявление мутации *TET2* для прогноза общей выживаемости пациентов с ПТКЛ и тип опухолевого микроокружения, определяемый с помощью иммуногистохимии, у пациентов со скПКР при назначении ипилимумаба и ниволумаба.

Теоретические материалы диссертации внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ РФ (г. Иваново) для студентов 3 курса лечебного и педиатрического факультетов, а также ординаторов и аспирантов.

Считаем целесообразным внедрять результаты диссертационного исследования в специализированных медицинских учреждениях Российской Федерации.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным исследованиям (ГОСТ 7.0.11-2011). Диссертационная работа выполнена по традиционному плану, изложена на 138 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, четырех разделов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 175 источников. Работа иллюстрирована 8 таблицами, 46 рисунками.

Введение полностью отражает актуальность представленной темы и необходимость проведения научных исследований по данному вопросу, научную новизну и практическую значимость работы. Четко сформулированы цель и задачи исследования.

Обзор литературных источников занимает 29 страниц и отображает глубокую осведомленность автора о применении методик NGS для количественного определения некоторых биомаркеров. Отдельное внимание уделяется существующим омиксным технологиям анализа устройства опухолевого микроокружения. Подробно освещены работы по изучению конкордантности методов RNA-seq и ИГХ. Приведена высокая социальная значимость повышения эффективности противоопухолевой терапии за счет персонализированных подходов. Литературный обзор обосновывает выполнение диссертационной работы.

В главе, посвященной описанию материала и методов исследования, автором приведен дизайн диссертационного исследования, дана подробная клинико-демографическая характеристика каждой исследуемой когорты. В главе охарактеризованы основные этапы NGS, а также приведены спецификации в зависимости от использованной методики. Отдельное внимание уделяется преаналитике, в частности подготовке биоптатов к секвенированию и контролю качества. Приведены номера публичных когорт, на которых проводилась валидация полученных результатов.

Собственные результаты изложены диссертантом в 4 главе, состоящей из четырех разделов. В первом разделе автор доказывает применимость и конкордантность результатов анализа биомаркеров с помощью ИГХ и методом RNA-seq. Показано, что уровень белка PD-L1 у пациентов со скПКР, измеренный методом RNA-seq, совпадает с результатом, полученным с помощью ИГХ. Доказана конгруэнтность значений классических биомаркеров, полученных методом ИГХ и RNA-seq в солидных неоплазиях. Второй, третий и четвертый разделы посвящены поисковым исследованиям по идентификации биомаркеров у пациентов с неходжкинскими лимфомами.

В каждом из данных разделов в ретроспективном порядке приводится анализ данныхэкзома и транскриптома. Проанализированы клинические испытания NCT03542266 (азациитидин в качестве прекондиционирования перед СНОР у пациентов с ПТКЛ в качестве терапии первой линии) NCT02783625 (дувелисиб или комбинация с бортезомибом или ромидепсином у пациентов с Р/Р ПТКЛ) и NCT02631044 (анти CD19 CAR Т лимфоциты у пациентов с Р/Р ДВККЛ).

Текст диссертационной работы Сорокиной М.А. завершается обобщением полученных результатов. Выводы и положения, выносимые на защиту, логично вытекают из содержания диссертации, соответствуют поставленным задачам, подтверждаются полученными результатами. Работа представляет собой завершенное диссертационное исследование, имеющее научно-практическое значение. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Диссертант логично выстроил диссертационную работу, четко ее структурировал и дополнил достаточным количеством рисунков и таблиц, облегчающих восприятие диссертации. Материал изложен понятным языком.

При общей положительной оценке данной работы необходимо отметить, что имеются отдельные опечатки и стилистические ошибки, которые не носят принципиального характера и не снижают высокую значимость представленной диссертационной работы.

### **Публикации и апробация результатов исследования**

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).

Результаты диссертационной работы доложены на международной научной конференции «American Association for Cancer Research»



(Филадельфия, 2021), 63-й международной научной конференции «American Society of Hematology» (Атланта, 2021), 64-й международной научной конференции «American Society of Hematology» (Новый Орлеан, 2022), VIII Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 2022, 2023).


## **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 - персонализация противоопухолевой терапии и предсказание прогноза у пациентов с неходжкинскими лимфомами за счет выявления предиктивных биомаркеров ответа и резистентности на основе анализа экзома и транскриптома опухоли.

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.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании лаборатории иммунофармакологии федерального государственного бюджетного

учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 10 от «25» октября 2023 г.).

Заведующий лабораторией иммунофармакологии  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, лауреат премии ГК СССР  
по делам изобретений и открытий, профессор,  
доктор биологических наук  Бочарова Ольга Алексеевна

Подпись Бочаровой О.А. заверяю:  
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ  
онкологии им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России,  
кандидат медицинских наук  Кубасова Ирина Юрьевна



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)  
115522, Москва, Каширское шоссе д. 24  
E-mail: [operator@ronc.ru](mailto:operator@ronc.ru)  
Тел.: +7 (499) 444-24-24  
Официальный сайт: [www.ronc.ru](http://www.ronc.ru)