

Отзыв официального оппонента

доктора биологических наук Мартынкевич Ирины Степановны
на диссертационную работу Карповой Виктории Сергеевны «Клинические и молекулярно-генетические особенности диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям
3.1.28. Гематология и переливание крови и 1.5.7. Генетика

Актуальность темы исследования

В течение последних десятилетий в онкогематологии все шире находят свое применение молекулярно-генетические технологии.

При этом высочайшую информативность в изучении диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) показали различные подходы молекулярного профилирования: геномного, транскриптомного и протеомного. С помощью данных методов были значительно углублены знания о молекулярной гетерогенности, характерной для данного варианта неходжкинских злокачественных лимфом. В свою очередь, это обеспечило не только лучшее понимание биологии опухоли, но и объяснило причины различной реакции ДВККЛ на цитостатическую и таргетную терапию. В частности, в 2020 г. был предложен алгоритмом генетического профилирования LymphGen, позволяющий разбить случаи ДВККЛ на семь генетических подтипов, которые различаются по молекулярному патогенезу, спектру экспрессии генов, фенотипу микроокружения опухоли, показателям выживаемости и потенциальным терапевтическим мишеням.

Вместе с тем, одним из малоизученных аспектов заболевания являются случаи ДВККЛ с вовлечением ЦНС. Их исследование крайне затруднено в силу невысокой частоты встречаемости, сопоставимой с частотой орфанных патологий, и выраженной тяжести больных, а, следовательно, редкости выполнения забора биопсийного материала из очага поражения в ЦНС.

Большинство существующих молекулярных данных по ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС до последнего времени были получены путем локус-специфических подходов, нацеленных на поиск точечных поломок в отдельных генах-кандидатах. Известно, например, что риск рецидива лимфомы с поражением центральной нервной системы высок у пациентов с хромосомными транслокациями с вовлечением генов *MYC*, *BCL2* и/или *BCL6*, которые встречается в 5-10% случаев заболевания (double-hit и triple-hit варианты).

Продвижения именно в данной области, в том числе за счет применения новейших молекулярно-генетических подходов, может способствовать обнаружению специфических генетических сигнатур, связанных с рецидивом ДВККЛ в ЦНС, улучшению прогнозирования течения и лечения заболевания и обоснованному отбору пациентов для профилактики вовлечения в опухолевый процесс центральной нервной системы.

В этой связи диссертационная работа Карповой В.С. является высоко актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность научных положений не вызывает сомнений.

Автором проведена работа с использованием сведений из международной базы CBioPortal for Cancer Genomics, которая содержит сведения о молекулярно-генетических профилях около 1300 пациентов с ДВККЛ, из которой были отобраны для анализа 48 случаев с вторичным вовлечением ЦНС и 355 без такового. Такой подход позволил сформировать крупную выборку пациентов с рецидивом в лимфомы ЦНС и группу сравнения.

Также диссертантом проведен собственный эксперимент по полноэкзомному секвенированию на платформе Illumina, биоинформационный анализ его результатов с помощью сервиса NGS-Wizard, а также дальнейшая характеристика находок по 75 ключевым генам,

участвующим в лимфогенезе, с применением современных программ Oncoprinter (для оценки сочетанности мутаций в биологических образцах) и Lollipops (для оценки распределения выявленных мутаций в последовательности гена), а также пяти предикторных программ SIFT, PolyPhen2, LRT, MutationAssessor и PROVEAN (для оценки функционального эффекта миссенс-замен). Для оценки онкогенности и клинической значимости выявленных мутаций Карпова В.С. пользовалась современными Руководствами по интерпретации клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования, а также Стандартами классификации патогенности соматических вариантов при раке: Объединенные рекомендации Clinical Genome Resource, Cancer Genomics Consortium и Cancer Consortium.

Важно отметить, что в дальнейшем результаты анализа данных CBioPortal for Cancer Genomics и собственного высокопроизводительного секвенирования были сопоставлены и обобщены.

Выводы диссертации закономерно вытекают из основных научных положений, защищаемых автором.

Результаты диссертационной работы отражены в 11 печатных работах, из них 4 статьи опубликованы в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, 2 статьи опубликованы в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Chemical Abstracts.

Полученные результаты были широко представлены на российских и зарубежных научно-практических конференциях, включая European Society of Human Genetics Conference (Берлин, 2020), 11th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (Новосибирск, 2020).

Научная новизна и практическая ценность диссертационного исследования

Научная новизна исследования несомненна.

В настоящее время исследований, посвященных изучению мутационного профиля диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением ЦНС крайне мало: в литературе имеются отдельные работы с описанием результатов высокопроизводительного секвенирования единичных случаев данного варианта заболевания с рецидивом в ЦНС.

Следует отметить, что Карповой В.С. первые представлены данные по спектру мутаций в образцах опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ и вторичным вовлечением ЦНС на крупной выборке пациентов (57 случаев), сформированной по открытым источникам (48 человек из CBioPortal for Cancer Genomics database) и на основании собственных данных (9 пациентов).

Впервые автором выполнено изучение мутационного статуса лимфомы с рецидивами в ЦНС на основании анализа первичного биоматериала – биоптатов опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, полученных на начальных этапах диагностики. Обоснованием для данного подхода послужили наблюдения, касающиеся вовлечения нервной системы у больных ДВККЛ за первые полгода течения заболевания, а также регистрации изолированных рецидивов ДВККЛ в ЦНС, и свидетельствующие о ранней миграции опухолевых клеток за гематоэнцефалический барьер.

Впервые идентифицированы молекулярно-генетические маркеры опухолевых клеток, а именно мутации в генах *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *INO80*, *SMARCA4* и *ARID1A*, которые должны насторожить в отношении высокого риска вовлечения в опухолевый процесс ЦНС.

Впервые диссертантом описаны два молекулярных подтипа ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, по спектру наиболее частых мутаций аналогичных первичной лимфоме ЦНС и лимфоме Беркитта, к каждому из которых может относиться около трети случаев.

Таким образом, полученные в диссертационной работе данные позволили получить совершенно новую информацию о биологии опухоли, выявить новые молекулярно-генетические механизмы прогрессии лимфомы с поражением ЦНС.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Автором выбрана тема диссертационного исследования, которая является областью интереса современной онкогематологии.

Проведенное диссертационное исследование позволило выделить новые клинические и молекулярно-генетические факторы риска вторичного вовлечения ЦНС при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме. В частности, идентифицирован спектр генов, таргетное секвенирование которых позволяет получать прогностическую информацию, а также намечать персонализированные подходы к терапии данной опухоли.

Сложно переоценить важность изучения мутационного ландшафта диффузной В-крупноклеточной лимфомы по первичному биоматериалу с целью идентификации мутаций, способствующих разработке новых подходов к профилактике вовлечения ЦНС при лимфоме и подбору оптимальной терапии больных.

Карповой В.С. в соавторстве разработана и запатентована в Российской Федерации и Евразийской патентной организации скрининговая методика выявления замены 265 кодона гена *MYD88*, ассоциированной с риском вторичного вовлечения ЦНС при ДВККЛ «Способ выявления мутации p.L265P в гене *MYD88*».

Результаты данного исследования уже внедрены в учебный процесс на кафедре терапии, гематологии и трансфузиологии (ФПК и ППВ) ФГБОУ «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и используются при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами и курсантами по тематике «Лимфопролиферативные заболевания» используются материалы, касающиеся особенностей

поражения центральной нервной системы и факторов риска вторичного вовлечения центральной нервной системы у пациентов с системной диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой, а также в научной деятельности лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Структура, содержание и оценка диссертационной работы в целом, замечания по оформлению

Диссертационная работа изложена на 228 страницах машинописного текста и написана в традиционном стиле: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, обсуждения, заключения, выводов и практических рекомендаций.

Список цитируемой литературы содержит ссылки на 243 источника, 215 из которых – это работы зарубежных авторов. Диссертация хорошо иллюстрирована 24 рисунками и 24 таблицами.

Во введении диссертант убедительно доказывает актуальность, новизну и практическую значимость изучаемой темы, грамотно ставит цель и формулирует задачи исследования, приводит положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор свидетельствует о хорошем знании Карповой В.С. современного состояния изучаемой тематики. Информация изложена логично и интересно. Анализ данных литературы позволил автору убедительно продемонстрировать недостаточную изученность темы и доказать целесообразность применения высокопроизводительного секвенирования в своей работе с целью определения особенностей течения и прогнозирования вторичного вовлечения ЦНС при ДВККЛ.

В главе, посвященной материалам и методам исследования, детально отражена клиническая характеристика сравниваемых групп и методы лабораторно-инструментальной диагностики, а также специальные методы исследования. Все пациенты обследованы в соответствии с действующими национальными клиническими рекомендациями. Диагноз во всех случаях был верифицирован данными гистологического и иммуно-гистохимического исследований, сформулирован по критериям ВОЗ.

Специальные методы исследования включали анализ базы данных CBioPortal for Cancer Genomics и высокопроизводительное секвенирование образцов первичной опухолевой ткани. Патогенные и вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности были подтверждены методом прямого капиллярного секвенирования по Сенгеру и методами ПЦР. При статистическом анализе, кроме стандартных подходов, были использованы специальные программы и биоинформационные методы. Это свидетельствует о высоких профессиональных качествах соискателя, умении пользоваться современными базами данных, владении высокотехнологичными лабораторными методиками и новыми методами биоинформационной обработки данных.

В третьей главе проведен анализ полученных результатов исследования, имеющего уникальный дизайн. На первом этапе в сравнительном аспекте изучается клиничко-лабораторная характеристика и эффективность терапии случаев ДВККЛ без вовлечения ЦНС, а также с изолированным и вторичным поражением центральной нервной системы. На втором этапе проводится анализ мутационного профиля ДВККЛ из базы данных CBioPortal for Cancer Genomics database, подкрепляемый собственными данными высокопроизводительного секвенирования образцов опухоли больных лимфомой с вторичным поражением ЦНС. Это позволило обобщить данные и получить принципиально новую информацию о биологии опухоли, выявить новые молекулярно-генетические механизмы патогенеза и прогрессии лимфомы с поражением ЦНС, связанные с мутациями в генах

NF-κB сигнального пути (*MYD88, NOTCH1, CD79B, CARD11*), нарушения в онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина (*ARID1A, KMT2D, SMARCA4*), с мутациями в гене JAK-STAT сигнального пути (*PIM1* и *STAT3*), а также с мутациями в главном онкосупрессорном гене *TP53*.

Итог анализа материалов диссертации изложен в разделе «Обсуждение полученных результатов». Автором дается их научное обоснование и корректное сопоставление с данными зарубежных авторов, проводится анализ литературы, использованной автором. Интересными и значимыми представляются полученные данные о том, что несмотря на кажущуюся гетерогенность мутационного профиля ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, в большей части случаев для опухолевых клеток характерны генетические нарушения, приводящие к продукции злокачественными лимфоцитами большого количества провоспалительных цитокинов, а также абберрации, снижающие иммуногенность и/или способствующие избеганию опухолью иммунного надзора.

Раздел «Заключение» представляет собой хорошо проработанное и обоснованное подведение итогов исследования.

Выводы логичны, соответствуют цели и задачам научного исследования. Достоверность их не вызывает сомнения, так как они обоснованы комплексом современных клиничко-лабораторных и молекулярно-генетических исследований, статистическим анализом, активным использованием современных баз данных и компьютерных ресурсов для анализа *in silico*.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями действующего ГОСТ.

Личный вклад соискателя

Автор диссертационного исследования участвовал в разработке дизайна исследования, внес личный вклад в формулировку цели и задач исследования, самостоятельно проводил выполнение всех этапов работы: анализ данных литературы, сбор биологического материала и клинических

данных, проводил статистическую обработку данных, обобщение, интерпретацию научных результатов, обсуждение результатов исследования и формирование выводов.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

В автореферате Карповой В.С. отражено основное содержание диссертации, которое соответствует указанным специальностям и теме исследования. Автореферат написан в полном соответствии с требованиями пунктов 9-14 постановления Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 18.03.2023) "О порядке присуждения ученых степеней" (вместе с "Положением о присуждении ученых степеней")

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Карповой В.С. нет.

Заключение

Диссертационная работа Карповой В.С. «Клинические и молекулярно-генетические особенности диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы», выполненная под руководством доктора медицинских наук, профессора Поспеловой Татьяны Ивановны и доктора медицинских наук Воропаевой Елены Николаевны, представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови и 1.5.7. Генетика, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача: на основании анализа клинико-лабораторных данных и мутационного спектра, полученного с применением методов высокопроизводительного секвенирования, установлены особенности течения и прогностические факторы вторичного вовлечения ЦНС при ДВККЛ. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата наук постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 18.03.2023) "О порядке присуждения ученых степеней" (вместе с "Положением о присуждении

ученых степеней"), а ее автор, Карпова Виктория Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28. Гематология и переливание крови и 1.5.7 Генетика

Официальный оппонент:

Руководитель научно-исследовательским
Центром клеточной и молекулярной патологии
ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России,
доктор биологических наук

05.12.2023

Мартынкевич Ирина Степановна

Подпись д.б.н., Мартынкевич И.С. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России,
доктор медицинских наук



Павлова Ирина Евгеньевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»,

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-Советская, д.16

Телефон: +7 (812) 309-79-81

e-mail: bloodscience@mail.ru