

Отзыв официального оппонента
доктора биологических наук Мартынкевич Ирины Степановны
на диссертационную работу Чуркиной Марии Игоревны на тему:
«Метилирование генов р53-чувствительных микроРНК *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме», 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

Диффузная В-крупноклеточная лимфома является крайне агрессивной опухолью с продолжительностью жизни без лечения – менее одного года. В случаях достижения ремиссии заболевания на современных программах лечения наибольшее количество рецидивов ДВККЛ приходится на первые 2 года с момента постановки диагноза, что обуславливает крайне плохой исход: 5-летние показатели общей выживаемости в группе рефрактерно-рецидивирующего течения составляют 22,6% в сравнении с 82,5% в группе с достижением долгосрочной полной ремиссии.

Исследования по профилированию экспрессии генов в опухолевой ткани пациентов с лимфомой привели к выявлению нескольких молекулярных подгрупп заболевания, имеющих различия в клиническом течении и прогнозе: подтипы из активированных В-клеток (ABC) и В-клеток зародышевого центра лимфоузла (GCB). Несмотря на гетерогенность каждого из подтипов, принято считать, что прогноз может быть менее благоприятным при подтипе ABC.

Вместе с тем установлено, что обнаруживаемые при ABC и GCB подтипах особенности экспрессионных профилей не могут быть полностью объяснены генными и геномными мутационными событиями, что предполагает наличие важной эпигенетической компоненты. Все большее значение в патогенезе ДВККЛ придается нарушениям в регуляции метилирования ДНК и модификации гистонов, а также дисбалансу малых некодирующих РНК.

Изменение экспрессии генов с помощью эпигенетических механизмов, является важной чертой большинства злокачественных новообразований. Вместе с тем, показана выраженная вариабельность метилирования ДНК и уровня проонкогенных и онкосупрессорных микроРНК у пациентов с лимфомами, которые могут лежать в основе биологической гетерогенности ДВККЛ и имеют потенциал в качестве маркера для деления данного заболевания на различные клинически значимые подтипы.

Изменение метилома и спектра экспрессируемых микроРНК в опухолевых клетках могут влиять на реализацию p53-сигнального пути, связанного с апоптозом, регуляцией клеточного цикла, а, следовательно, опосредующего противоопухолевые эффекты широкого спектра препаратов.

Таким образом, явление эпигенетической изменчивости ДВККЛ может быть причиной клональной эволюции и химиорезистентности данной опухоли. Однако для определения вклада метилирования ДНК и микроРНК в клональную эволюцию лимфомы потребуются дальнейшие исследования.

В связи с этим, не вызывает сомнения актуальность диссертационной работы Чуркиной Марии Игоревны, посвященной изучению сочетанности и клинического значения метилирования генов микроРНК, а также его связи с абберациями в гене *TP53* при ДВККЛ.

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

Обоснованность научных положений не вызывает сомнений.

Автором проведен анализ одной из самых крупных отечественных выборок больных ДВККЛ, включающей 136 пациентов с подтвержденным, согласно критериям ВОЗ, диагнозом, что обеспечивает репрезентативный объем клинических наблюдений. В качестве контроля была сформирована группа больных с патоморфологически и иммуногистохимически подтвержденной реактивной фолликулярной В-клеточной гиперплазией (n=11).

В работе применялись современные молекулярно-генетические методы исследования: прямое капиллярное секвенирование по Сенгеру, бисульфитная конверсия ДНК, метил-специфичная ПЦР, метил-чувствительный анализ кривых плавления высокого разрешения, а также биоинформационная обработка полученных данных с применением современных программ для оценки сочетанности мутаций в биологических образцах, анализа распределения выявленных мутаций по последовательности гена, а также предсказания функционального эффекта миссенс-замен.

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

Результаты диссертационной работы отражены в 18 печатных работах, в том числе 8 статьях в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, в том числе 4 статьи в журналах категории K1 и 5 статей в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Chemical Abstracts.

Полученные результаты были широко представлены на российских, международных и зарубежных научно-практических конференциях, включая European Human Genetics Conference (Вена, 2022) и Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology Conference (Новосибирск, 2022).

Научная новизна и практическая ценность диссертационного исследования

Научная новизна исследования несомненна.

Представленная работа является первым комплексным исследованием метилирования панели генов пяти p53-чувствительных микроРНК и aberrаций в гене *TP53* при ДВККЛ.

Автором исследования впервые установлены частоты метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани больных ДВККЛ, доказана опухоль-специфичность данного явления.

Впервые показано, что при ДВККЛ статус метилирования анализируемых генов достоверно коррелирует друг с другом.

Вместе с тем, результаты комплексного анализа свидетельствуют о независимом характере обнаружения aberrаций в гене *TP53* и метилирования генов изучаемых микроРНК в опухолевой ткани пациентов с лимфомой. Таким образом, автором впервые доказано, что метилирование изученных генов может быть одним из важных и независимых от мутаций в гене *TP53* механизмов нарушения экспрессии микроРНК miR-203, mir-129, miR-34a, miR-34b и miR-34c при ДВККЛ.

По итогам работы впервые идентифицирована ассоциация метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2* с большим пролиферативным потенциалом клеток лимфомы и показателями параклинической активности опухоли, а также метилирования *MIR-34A* с неблагоприятным прогнозом по международному прогностическому индексу и снижением показателей эффективности терапии по протоколу R-CHOP. Выявлена

большая частота метилирования *MIR-34A* у больных лимфомой старшей возрастной группы.

Таким образом, полученные в диссертационной работе данные позволили получить совершенно новую информацию о биологии опухоли и выявить новые молекулярно-генетические механизмы прогрессирования ДВККЛ.

Теоретическая и практическая значимость исследования

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

Результаты проведенного диссертационного исследования служат обоснованием применения оценки метилированного статуса *MIR-129-2* и *MIR-203*, а также генов семейства *miR-34* в качестве дополнительных биомаркеров для дифференциальной диагностики ДВККЛ и реактивных лимфаденопатий.

Метилирование *MIR-34A* в клинической практике может помочь в стратификации пациентов на группы риска неэффективности стандартного лечения ДВККЛ.

Полученные данные свидетельствуют о потенциале дальнейших исследований, направленных на разработку таргетных подходов терапии, способствующих снятию aberrантного гиперметилирования генов *p53*-чувствительных микроРНК.

Результаты диссертационного исследования были внедрены в учебный процесс кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, а также практику отделения гематологии Городского гематологического центра г. Новосибирска ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 2».

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» используются полученные данные для дальнейших исследований, направленных на разработку таргетных подходов снятия aberrантного метилирования генов *p53*-чувствительных микроРНК в качестве стратегии лечения лимфомы.

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

Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста, построена по классическому варианту и содержит введение, четыре главы (обзор литературы, материал и методы, результаты диссертационного исследования, заключение), выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы и список иллюстративного материала.

Список цитируемой литературы представлен 326 источниками, из которых 305 в зарубежных изданиях. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 17 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 Чуркиной М.И. современного состояния изучаемой тематики. Информация изложена логично и интересно. Анализ данных литературы позволил автору убедительно продемонстрировать недостаточную изученность темы и доказать целесообразность изучения статуса метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* с целью определения особенностей течения и прогнозирования ответа ДВККЛ на терапию.

В главе, посвященной материалам и методам исследования, детально отражена клиническая характеристика пациентов, 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 иммуногистохимического исследований, сформулирован по действующим критериям ВОЗ.

Специальные методы исследования включали выделение ДНК фенол-хлороформным методом с гуанидином, бисульфитную конверсию, бисульфитное секвенирование, методы метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения и метил-специфичной ПЦР, прямое секвенирование по Сэнгеру, метод ПЦР с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов. При статистическом анализе кроме стандартных методов в программе SPSS 16.0 для Windows были использованы специальные программы и методы анализа: онлайн-сервис OncoPrinter,

программа Lollipops, предикторные программы (SIFT, PolyPhen2, LRT, MutationAssessor и PROVEAN)

В третьей главе проведено описание полученных результатов исследования, имеющего уникальный дизайн. Автором дается научное обоснование полученных результатов и корректное сопоставление с данными зарубежных авторов. Интересными и значимыми представляются полученные в диссертации сведения о том, что при диффузной В-крупноклеточной лимфоме аберрации в гене *TP53* и метилирование анализируемых генов p53-чувствительных микроРНК являются независимыми событиями с тенденцией к взаимному исключению.

Итог анализа материалов диссертации изложен в разделе «Заключение».

Выводы логичны, соответствуют цели и задачам научного исследования. Достоверность их не вызывает сомнения, так как они обоснованы комплексом современных клинико-лабораторных и молекулярно-генетических исследований, статистическим анализом и активным использованием 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 Чуркиной М.И. 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 842 (ред. От 18.03 2023) «О порядке присуждения ученых степеней» (вместе с «Положением о присуждении ученых степеней»).

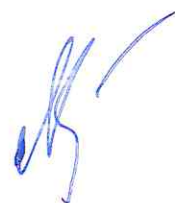
Принципиальных замечаний по диссертационной работе Чуркиной М.И. нет.

Заключение:

Диссертационная работа Чуркиной М.И. на тему: «Метилирование генов p53-чувствительных микроРНК *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме», 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: изучены частота, сочетанность и клиническое значение метилирования генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C*, а также определена его связь с абберациями в гене *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Диссертация соответствует всем 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, Чуркина Мария Игоревна, 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-исследовательского
центра клеточной и молекулярной патологии
ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России,
доктор биологических наук



«29»_апреля 2024 г.

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-я Советская, д.16
Телефон: +7 (812) 309-79-81, e-mail: bloodscience@mail.ru