

Отзыв

официального оппонента, доктора медицинских наук, Суспицына Евгения Николаевича на диссертационную работу Друя Александра Евгеньевича «Идентификация и неинвазивная диагностика молекулярно-генетических aberrаций при периферических эмбриональных нейрогенных опухолях у детей», представленную на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальностям 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия; 3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы исследования

Периферические нейрогенные эмбриональные опухоли развиваются из примитивных клеток симпатической нервной системы и мозгового вещества надпочечников преимущественно у детей раннего возраста. Среди них доминирующей нозологической формой является нейробластома (НБ), клинические проявления и биологическая агрессивность которой варьируют в широких пределах и определяются молекулярно-генетическими драйверами канцерогенеза данной опухоли. Для больных первого года жизни характерно благоприятное течение заболевания с тенденцией к спонтанному регрессу или созреванию, тогда как в более старшей возрастной группе наблюдается агрессивное течение заболевания с высокой частотой случаев рецидива и прогрессии опухоли. Учитывая морфологическую идентичность НБ с диаметрально противоположным клиническим течением, молекулярно-генетические факторы прогноза являются ключевыми в стратификации пациентов на группы риска и выбора оптимальной интенсивности лечения. Первый молекулярный маркер НБ, неблагоприятное прогностическое значение которого было доказано, амплификация гена *MYCN*, встречается в 16–22% случаев. Данный признак остаётся актуальным и в настоящее время и используется как ведущий критерий стратификации пациентов в группу высокого риска во всех терапевтических протоколах лечения НБ. Однако не все случаи неблагоприятного течения заболевания могут быть объяснены наличием амплификации *MYCN*.

Негативное прогностическое значение имеют также несбалансированные сегментарные хромосомные aberrации, в частности делеции 1p и 11q, но существующие методы стратификации пациентов на группы риска остро нуждаются в расширении, в том числе, за счёт дополнительных патогенетически-обоснованных молекулярно-генетических маркеров.

Несмотря на использования всех модальностей современного противоопухолевого лечения, выживаемость пациентов с НБ группы высокого риска находится на уровне 60%. Преодоление данного порога может быть достигнуто при использовании инновационных методов лечения, таких как иммунотерапия и молекулярно-направленная терапия опухоли. Для полноценной реализации терапевтического эффекта необходимо определение групп пациентов, способных получить максимальную пользу от каждого метода лечения, что требует идентификации и проспективной валидации предиктивных молекулярно-генетических маркеров.

Соответствие темы диссертации указанным научным специальностям

Тема диссертации полностью соответствует научным специальности 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия, а именно п. 2 Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.) и п. 6. Изучение на молекулярном, клеточном и органном уровнях особенностей возникновения и развития онкологических заболеваний в детском и подростковом возрасте. Разработка и совершенствование методов диагностики, лечения и профилактики в области педиатрической онкологии; а также специальности 3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика, а именно п. 3. Клинико-лабораторные методы исследования для определения тяжести, периода и срока болезни, прогноза, контроля за лечением и его результатами, п. 9. Разработка методов иммунологических исследований. Антигены эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, белков плазмы, HLA-системы. Оценка функциональной активности клеток иммунной системы. Антитела естественные,

иммунные и аутоиммунные, иммунные комплексы. Медиаторы иммунитета. Оценка иммунного статуса организма. Мониторинг иммунокорректирующей терапии. Иммунофенотипическая характеристика клеток при заболеваниях крови. Онкоиммунология и п. 11. Цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследований.

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

Цель и задачи диссертационного исследования грамотно сформулированы. Для решения поставленных задач, было проведено исследование, включавшее как ретроспективную, так и проспективную группу пациентов. Суммарно были проанализированы 534 пациента с медианой времени наблюдения 4,6 г. Анализ прогностических маркеров, механизмов взаимодействия клеток опухоли с реактивным микроокружением и феномена созревания нейрогенных опухолей осуществлялся ретроспективно, тогда как клиническое значение данных высокопроизводительного секвенирования опухолевой ДНК, в том числе, предиктивных маркеров, анализировалось на проспективной когорте больных.

Все пациенты получали стандартизованную терапию по модифицированному протоколу NB2004 Группы детской онкологии и гематологии (GPOH, Германия). В зависимости от решаемых задач молекулярно-генетические исследования проводились в подгруппах пациентов и включали анализ экспрессии генов с помощью экспрессионных чипов высокой плотности, технологии NanoString и ПЦР в режиме реального времени, высокопроизводительное секвенирование ДНК, секвенирование по Сэнгеру. Для выявления стандартных молекулярных маркеров НБ применялись методы флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и множественной лигазно-зависимой амплификации зондов (MLPA). Функциональная валидация выявленных инактивирующих aberrаций в гене *ATRX* и активации сигнального пути RAS-RAF-МЕК осуществлялась методом иммуногистохимии на основании потери ядерной экспрессии белка *ATRX* и наличия экспрессии фосфорилированной формы белков ERK1/2. В ходе выполнения работы автору удалось

проанализировать чрезвычайно редкие случаи созревания нейрогенных опухолей ЦНС и, таким образом, доказать идентичность молекулярных механизмов, лежащих в основе дифференцировки опухолей нейроэктодермального происхождения как центральной, так и периферической локализации.

Анализ полученных результатов был осуществлён на высоком методологическом уровне с использованием современных и актуальных методов биоинформатики и биомедицинской статистики. На основании данных, полученных в работе, были определены 6 положений, выносимых на защиту, которые являются обоснованными и находят подтверждение в тексте диссертации и автореферата.

Результаты диссертационного исследования были многократно доложены на научных форумах различного уровня, а также опубликованы в виде 36 печатных работ, 18 из которых – статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность результатов, а также выводов и практических рекомендаций, сформулированных на их основе, подтверждаются значительной выборкой пациентов, грамотным использованием высокотехнологичных молекулярно-генетических технологий и методов математической обработки данных. Научная новизна работы заключается в разработке оригинальной экспрессионной панели, позволяющей осуществлять диагностику на основе архивных патоморфологических образцов опухолевой ткани; определении прогностической роли глобальной дисрегуляции системы малых некодирующих РНК и потери экспрессии онкосупрессорной микро-РНК miR-128-3p; обосновании разделения образцов НБ по степени иммуногенности и определении транскриптов, позволяющего дискриминировать данные подтипы опухоли. Также впервые была продемонстрирована идентичность молекулярных механизмов созревания нейрогенных опухолей центральной и периферической нервных систем, обосновано введение второго возрастного порога изменения биологии и клиники

НБ и необходимость выявления aberrаций в гене *ATRX* для объективизации данного перехода, показана возможность реализации предиктивных маркеров иммунотерапии (микросателлитной нестабильности и высокой мутационной нагрузки) у пациентов с НБ. Отдельного внимания заслуживает установление взаимосвязи морфологических и молекулярных характеристик опухоли с данными количественной МРТ, в частности, измераемым коэффициентом диффузии. Полученные результаты могут послужить основой для внедрения предоперационной МРТ для эффективного прогнозирования неблагоприятных прогностических маркеров опухоли.

Предлагаемые практические рекомендации воспроизводимы и могут быть масштабированы в специализированных лечебных учреждениях, осуществляющих помощь детям с онкологическими заболеваниями.

Содержание диссертации и общая характеристика работы

Диссертационная работа построена по стандартному принципу, оформление отвечает требованиям ВАК и ГОСТ. Работа представлена на 343 страницах текста формата А4 и содержит главы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Экспрессионная гетерогенность нейрогенных опухолей», «Иммунология нейрогенных опухолей. Исследование взаимодействия опухоли и микроокружения», «Исследование молекулярных механизмов феномена созревания нейрогенных опухолей», «Анализ клинического значения генетических aberrаций, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования ДНК», «Установление взаимосвязи между молекулярно-генетическими характеристиками и радиологическим фенотипом опухоли. Радиогеномика периферических нейрогенных опухолей», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Список литературы». В диссертации имеются ссылки на 517 литературных источников, из них 24 русскоязычных и 493 зарубежных публикации. Иллюстративный материал включает 33 таблицы и 98 рисунков.

Во введении обосновывается актуальность исследования, приводятся цель, задачи, научная новизна, практическая значимость, положения диссертационной работы, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» написан в соответствии с целью работы и обобщает накопленные сведения о клинических особенностях и терапии периферических нейрогенных опухолей у детей, патогенезе и молекулярных характеристиках, лежащих в основе их гетерогенности. Приводятся данные о молекулярно-генетических маркерах, использующихся для стратификации пациентов на группы риска, об использовании инновационных лечебных технологий – иммунотерапии и таргетной терапии для улучшения результатов лечения пациентов с неблагоприятной формой НБ. Отдельный раздел посвящён принципам анализа и классификации генетических вариантов, выявляемых при секвенировании опухолевой ДНК.

В главе «Материалы и методы» описываются молекулярные технологии, с помощью которых были получены данные, методики их обработки и анализа. Также приводятся клинические характеристики пациентов исследованной группы и методология анализа данных количественной МРТ. В отдельном разделе подробно описываются использованные биоинформатические алгоритмы и методы статистической обработки данных.

Первая глава с результатами исследований носит название «Экспрессионная гетерогенность нейрогенных опухолей» и включает анализ экспрессии белок-кодирующих генов и генов микроРНК. Было показано, что в силу значительной деградации РНК фиксированный опухолевый материал не может быть использован для профилирования экспрессии генов с помощью гибридизационных чипов. Напротив, технология NanoString обладает значительно меньшей чувствительностью к качеству анализируемой РНК и позволяет эффективно осуществлять количественную оценку транскриптов. На основании дифференциальной экспрессии генов в образцах НБ, различающихся по клиническому течению, были определены наборы транскриптов, пригодных для создания диагностической панели, направленной на прогнозирование

агрессивности опухоли. Важно подчеркнуть, что белковые продукты генов, имеющих повышенную экспрессию в образцах неблагоприятных НБ, задействованы в процессах биосинтеза нуклеиновых кислот, репликации ДНК и позитивной регуляции клеточного цикла. При этом гены, экспрессия которых характерна для благоприятных форм НБ, вовлечены в метаболические внутриклеточные процессы и биохимические процессы физиологии нервной ткани. На основании дифференциальной экспрессии генов была предложена диагностическая панель, которая позволяет эффективно прогнозировать наступление неблагоприятного события, что наиболее актуально для пациентов групп низкого и промежуточного риска, которые могут выиграть от своевременной интенсификации терапии.

Экспрессионное профилирование позволило установить, что сигнальный путь рецепторных тирозинкиназ доминирует в молекулярном патогенезе НБ вне зависимости от факта выявления соответствующих активирующих мутаций. Данной наблюдение было подтверждено наличием экспрессии белков фосфо-ERK1/2 в подавляющем большинстве случаев НБ. Анализ микроРНК выявил феномен снижения экспрессии множества малых некодирующих РНК, сопровождающий прогностически неблагоприятные опухоли. В качестве независимого фактора прогноза выступало снижение экспрессии микроРНК miR-128-3p, обладающей функцией гена-супрессора опухолевого роста. В случае сочетания с известным негативным прогностическим фактором – гиперэкспрессией гена каталитической субъединицы теломеразы – *TERT*, выживаемость пациентов была крайне низкой и не отличалась от выживаемости пациентов с амплификацией гена *MYCN*.

Глава «Иммунология нейрогенных опухолей. Исследование взаимодействия опухоли и микроокружения» посвящена исследованию иммунологических процессов в ткани НБ, для анализа которых изучалась экспрессия генов, задействованных в данных процессах, а также специфичных для отдельных типов иммунокомпетентных клеток. Когорта пациентов, исследованная в данной главе, была разделена на две группы: первая включала случаи нейрогенных опухолей,

сопровождающихся развитием иммуноопосредованного паранеопластического синдрома опсоклонус-миоклонус (ОМС) и сбалансированные по клиническим параметрам образцы опухолей без ОМС. Вторая группа состояла из образцов НБ всех групп риска с различными клиническими и генетическими характеристиками, которые не сопровождались развитием паранеопластических синдромов. Были выявлены 20 генов, экспрессия которых оказалась значимо выше в образцах опухолей, сопровождающихся ОМС, на основании чего они были использованы для разделения НБ по степени иммуногенности. Случаи НБ без признаков паранеопластических синдромов также были разделены на основании уровня экспрессии указанных генов. Несмотря на отсутствие непосредственного прогностического значения, данное разделение может быть перспективно для определения показаний к проведению терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, поскольку, несмотря на признаки значительной представленности иммунокомпетентных клеток в микроокружении иммуногенных НБ, были выявлены признаки истощения эффекторных клеток (экспрессия генов *PDCD1* и *CTLA4*), продукты которых могут послужить мишенями для фармакологического воздействия.

В разделе «Исследование молекулярных механизмов феномена созревания нейрогенных опухолей» обсуждаются молекулярные механизмы созревания данных неоплазий. Спонтанное или индуцированное терапевтически снижение злокачественности НБ является хорошо задокументированным процессом, однако его биологические основы продолжают оставаться неизученными. В литературе приводятся описания отдельных случаев созревания опухолей ЦНС, которые, в силу редкости феномена, носят несистемный характер. В диссертационной работе парные образцы опухолей в дебюте заболевания и в исходе созревания изучены с помощью технологий экспрессионного анализа и высокопроизводительного секвенирования. В исследовании проводятся параллели между механизмами созревания центральных и периферических нейрогенных опухолей. Универсальными являются разнонаправленная динамика изменения экспрессии генов *NTRK1* (снижение) и *NTRK2* (нарастание) в процессе созревания, снижение

в созревающих опухолях экспрессии негативных эпигенетических регуляторов (*EZH2*, *DNMT3A*, *HDAC10*) и нарастание экспрессии генов позитивных эпигенетических регуляторов (кодирующих компоненты комплекса SWI/SNF) в образцах опухолей, подвергшихся в дальнейшем созреванию.

В главе «Анализ клинического значения генетических aberrаций, выявленных методом высокопроизводительного секвенирования ДНК» проанализированы результаты секвенирования опухолевой ДНК 270 пациентов с агрессивной НБ, которым данное исследование выполнялось, в первую очередь, для поиска мишеней для использования молекулярно-направленной терапии. Было показано, что таргетное секвенирование ДНК является надёжным методом не только для выявления нуклеотидных вариантов, но также прогнозирования аномалий числа копий генов. В работе приводится анализ спектра aberrаций в образцах НБ, а также установление их клинической значимости. В частности, активирующие миссенс-мутации в гене *ALK* и увеличение числа копий гена рассматриваются в качестве маркеров чувствительности к низкомолекулярным ингибиторам *ALK*, приводятся данные об эффективности указанных препаратов.

Была показана ассоциация aberrаций гена *ATRX* (включающих делеции кодирующей последовательности гена, отдельных его экзонов с сохранением рамки считывания белка, нуклеотидных вариантов) со старшим возрастом манифестации НБ и специфическим медленно прогрессирующим клиническим течением. Выявление аномалий гена *ATRX* служит объяснением клинического феномена «подростковая НБ», которая требует отдельных подходов для эффективного лечения пациентов.

Среди проанализированных пациентов часто обнаруживались онкогенные варианты и делеции генов, задействованных в процессе гомологичной рекомбинации ДНК (*ATM*, *BRCA1/2*), при этом ни в одном случае не было отмечено биаллельной инактивации какого-либо из этих генов и, как следствие, реализации феномена дефицита гомологичной рекомбинации ДНК. Напротив, сочетание рекуррентной для НБ делеции 3p21 и повреждающей мутации в гене *MLH1* приводило к микросателлитной нестабильности в клетках опухоли. Также в

отдельных случаях в клетках НБ было зафиксировано увеличение мутационной нагрузки, генетическая причина которой была идентифицирована в 4 наблюдениях.

В главе «Установление взаимосвязи между молекулярно-генетическими характеристиками и радиологическим фенотипом опухоли. Радиогеномика периферических нейрогенных опухолей» приводятся ассоциации между данными количественной МРТ и морфологическими и молекулярными характеристиками периферических нейрогенных опухолей. Выявленное значимое соответствие данных параметров позволяет рассматривать МРТ в качестве неинвазивного инструмента для получения знаний не только о гистологической структуре опухоли, но также о наличии неблагоприятных молекулярно-генетических маркеров. Это является наиболее актуальным при невозможности проведения стандартной биопсии новообразования по причине тяжёлого соматического статуса пациента или сложной анатомической локализации опухоли.

В разделе «Обсуждение» автор обобщил итоги собственного исследования и провёл их сравнение с имеющимися на сегодняшний день знаниями по изучаемой теме. Выводы и практические рекомендации диссертационной работы обоснованы и подкреплены результатами исследования. Диссертация и автореферат оформлены с соблюдением всех требований к научно-квалификационным работам на соискание учёной степени доктора медицинских наук.

Научно-практическая значимость диссертационной работы

Проведённое исследование имеет большую научную и практическую значимость. Полученные результаты могут быть использованы детскими онкологами для совершенствования подходов к стратификации пациентов на группы риска, а врачами клинической лабораторной диагностики и лабораторной генетики – для увеличения точности и доступности молекулярно-генетических исследований у пациентов с различными видами злокачественных опухолей, а не только с НБ. Интенсификация лечения прогностически неблагоприятных форм НБ за счёт применения таргетной терапии на основании выявленных

предиктивных маркеров, обладает выраженной эффективностью и управляемым профилем токсичности, что делает его перспективным средством контроля заболевания у пациентов с исчерпанными возможностями терапии.

Фундаментальное значение работы заключается в анализе иммунологической гетерогенности НБ, а также установлении механизмов созревания опухолей. Несмотря на отсутствие непосредственной клинической значимости, данные результаты могут послужить основой для будущих клинических исследований с применением ингибиторов контрольных точек иммунного ответа и поиска триггеров дифференцировки злокачественных опухолей.

Заключение

Диссертационная работа Друзя Александра Евгеньевича «Идентификация и неинвазивная диагностика молекулярно-генетических aberrаций при периферических эмбриональных нейрогенных опухолях у детей», представленная на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальностям 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия; 3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика, является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области детской онкологии: решены актуальные научные проблемы поиска значимых факторов прогноза НБ, оценки гетерогенности опухоли, в том числе, на уровне взаимодействия клеток опухоли с реактивным микроокружением, интенсификации лечения неблагоприятной НБ за счёт применения таргетной терапии, неинвазивной диагностики прогностически-значимых маркеров опухоли.

Диссертационная работа Друзя А.Е. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям (пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённому постановлением правительства РФ от 24.09.2013 №842 в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от

29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 №415, от 26.10.2023 №1786, от 25.01.2024 №62), а её автор Друй Александр Евгеньевич заслуживает присуждения учёной степени доктора медицинских наук по специальностям 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия; 3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика.

Официальный оппонент

старший научный сотрудник научной лаборатории
молекулярной онкологии

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
доктор медицинских наук

Суспицын Евгений Николаевич



Подпись Суспицына Е.Н. заверяю

И секретарь

А.О. Швацков.

«17 апреля»

Почтовый адрес места работы: 197758, Россия, г. Санкт-Петербург,

пос. Песочный, ул. Ленинградская, дом 68

Сайт учреждения: <https://www.niioncologii.ru/>

Телефон: +7(812) 43-99-555

Сведения об официальном оппоненте

по защите диссертационной работы Друя Александра Евгеньевича на тему «Идентификация и неинвазивная диагностика молекулярно-генетических aberrаций при периферических эмбриональных нейрогенных опухолях у детей», представленной на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальностям 3.1.6. – Онкология, лучевая терапия; 3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

Ф.И.О.	Год рождения, гражданство	Место основной работы, должность	Учёная степень (с указанием шифра специальности, по которой защищена диссертация)	Учёное звание (по специальности или по кафедре)	Шифр специальности и отрасль науки	Основные работы
Суспицын Евгений Николаевич	1976, Российская Федерация	Старший научный сотрудник научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации	Доктор медицинских наук Докторская диссертация защищена по специальности 3.1.6 - Онкология, лучевая терапия 1.5.7 – Генетика	-	-	1. Смирнова, А.Ю. Атипичная тератоид-рабдоидная опухоль центральной нервной системы у ребенка первого года жизни: описание клинического случая / А.Ю. Смирнова, Е.Н. Суспицын , Е.Н. Имянитов и др. // Вопросы онкологии. – 2024. – Т. – 70, № 1. – С. 138-145. 2. Suspitsin, E.N. Hereditary conditions associated with elevated cancer risk in childhood / E.N. Suspitsin, E.N. Imyanitov // Biochemistry

					<p>(Moscow). – 2023. – Vol. 88, No. 7. – P. 880-891.</p> <p>3. Диникина, Ю.В. Клинические аспекты молекулярно-генетического тестирования в детской онкологии / Ю.В. Диникина, Е.Н. Имянитов, Е.Н. Суспицын и др. // Медицинский совет. – 2023. – Т. 17, – № 22. – С. 122-128.</p> <p>4. Янус, Г.А. Наследственная предрасположенность к злокачественным опухолям почки: опухолевые синдромы, мультисистемные заболевания и нефропатии / Г.А. Янус, А.Г. Ивлева, Е.Н. Суспицын и др. // Сеченовский вестник. – 2023. – Т. 14, – № 2. – С. 5-20.</p> <p>5. Imyanitov, E.N. Hereditary cancer syndromes / E.N. Imyanitov, E.S. Kuligina,</p>
--	--	--	--	--	---

					<p>A.P. Sokolenko, Suspitsin E.N. et al. // World Journal of Clinical Oncology. – 2023. – Vol. 14, – No. 2. – P. 40-68.</p> <p>6. Sokolova, T.N. Revisiting multiple erroneous genetic testing results and clinical misinterpretations in a patient with Li-Fraumeni syndrome: lessons for translational medicine / Sokolova, T.N., Shumskaya I.S., Suspitsin, E.N., Aleksakhina, S.N. et al. // Hereditary Cancer in Clinical Practice. – 2021. – Vol. 19. – No.1 – P.2.</p>
--	--	--	--	--	---

Не являюсь членом экспертного совета ВАК.

На обработку персональных данных согласен.

Официальный оппонент

старший научный сотрудник научной лаборатории молекулярной онкологии
 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
 Минздрава России, доктор медицинских наук

Суспицын Евгений Николаевич



Подпись Суспицына Е.Н. заверяю

Заместитель секретаря А.О. Иванцов.

« 17 апреля » 2025 г