

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора, заведующего клинико-диагностической лабораторией государственного учреждения здравоохранения «Минский областной клинический госпиталь инвалидов Великой Отечественной войны имени П.М. Машерова» Смоляковой Раисы Михайловны на диссертационную работу **Шляхтунова Евгения Александровича «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение»**, представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки

Диссертационная работа Шляхтунова Евгения Александровича «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение» посвящена повышению эффективности выявления минимальной остаточной болезни и адъювантного лечения пациенток, страдающих раком молочной железы на основе оценки экспрессии транскриптов генов *BIRC5*, *C-erbB-2 (HER-2/neu)* в опухолевой ткани и циркулирующих опухолевых клетках с использованием разработанных отечественных диагностических ОТ-ПЦР тест-систем. При выполнении диссертационного исследования соискателем разработаны, прошли клинические испытания, зарегистрированы в установленном порядке и налажен промышленный выпуск тест-систем для оценки экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu* с использованием в качестве эндогенного контроля гена *c-ABL*, обладающие аналитической чувствительностью более или равно 5 копиям в пробе и аналитической специфичностью 100% при раке молочной железы.

Разработанный Евгением Александровичем метод контроля эффективности адъювантной химиотерапии на основе определения экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu* в циркулирующих опухолевых клетках, а также предложенный соискателем метод адъювантной цитостатической терапии позволяет повысить эрадикацию циркулирующих опухолевых клеток и увеличить скорректированную пятилетнюю выживаемость на 11,6% до $90,3 \pm 3,8\%$ (95% ДИ: 86,5–94,1), а безрецидивную выживаемость на 7,4% до $88,0 \pm 4,4\%$ (95% ДИ: 83,6–92,4) у пациенток, страдающих раком молочной железы, с экономической эффективностью 11,8.

Содержание диссертационной работы «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение», сформулированная цель исследования, 7 задач, 6 аргументированных положений, вынесенных на защиту, полученные автором результаты и

сделанные выводы полностью соответствуют отрасли медицинские науки и специальности 14.01.12 – онкология.

Актуальность темы диссертации

Актуальность диссертационного исследования не вызывает сомнений, поскольку рак молочной железы (РМЖ) до настоящего времени, несмотря на значительные достижения в области фундаментальных и прикладных высокотехнологичных диагностических исследований, занимает одно из первых мест в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями у женщин. Согласно данным Международного интернационального агентства по изучению рака IARC–EUCAN (2015г.) скорректированная по возрасту ежегодная заболеваемость РМЖ в 2012 году в 40 европейских странах достигла 94,2%, а смертность – 23,1%.

В Республике Беларусь по данным национального канцер-регистра в 2018 году было зарегистрировано 4 679 новых случаев РМЖ. Пятилетняя выживаемость пациентов с впервые установленным диагнозом РМЖ в 2018г. составила 70,7%.

Следует отметить, что благодаря совершенствованию методов раннего выявления заболевания и повышению эффективности современных комбинированных протоколов лечения в большинстве стран мира отмечается снижение показателей смертности от РМЖ, особенно в молодых возрастных группах женского контингента пациентов. Вместе с тем, РМЖ продолжает оставаться ведущей причиной онкологической смертности у женщин.

В настоящее время доказано и является неоспоримым, что РМЖ представляет собой системный диссеминированный опухолевый процесс, выявление которого вызывает определенные диагностические трудности.

Установлено, что при резектабельном РМЖ после проведенного радикального лечения отдаленное метастазирование диагностируют до 40% пациентов в течение первых пяти лет, независимо от поражения регионарных лимфатических узлов.

До настоящего времени остаются нерешенными проблемы по лечению пациентов с метастатическими формами РМЖ, которые приводят к неблагоприятному прогнозу у данной категории пациентов.

Неудовлетворительные результаты лечения при РМЖ обусловлены, с одной стороны, клональной гетерогенностью первичной опухоли, с другой – молекулярно-генетическими отличиями сигнальных путей метастатического каскада, которые проявляются на геномном, эпигеномном и транскриптомном уровнях. В связи с этим приоритетным направлением в мировой фундаментальной и клинической онкологии является выявление и

генотипирование циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), в частности, циркулирующих опухолевых ДНК и РНК, с использованием технологии «жидкой биопсии» периферического кровотока, а также изучение внеклеточного опухолевого протеома и метаболома.

Учитывая тот факт, что ЦОК выявляются у преобладающего количества пациентов до начала специального лечения и могут сохраняться после радикально выполненных операций, актуальным является вопрос о дополнительной адьювантной системной противоопухолевой терапии, направленной на лечение минимальной остаточной болезни и эрадикацию циркулирующих опухолевых клеток.

Накопленные к настоящему времени научные и клинические данные свидетельствуют о том, что проведенная в полном объеме адьювантная химио- и гормонотерапия, в ряде случаев, неэффективны в эрадикации потенциально агрессивных ЦОК, что обусловлено их генетической гетерогенностью и развитием устойчивости отдельных клонов опухолевых клеток к системной химиотерапии.

Многоцентровые научные исследования показали преимущественное применение в качестве диагностики заболевания и мониторинга ведения пациентов определение циркулирующих опухолевых ДНК, РНК с использованием метода «жидкой биопсии», что позволяет преодолеть генетическую гетерогенность опухоли, получить объективные результаты исследования.

Мета-анализ мировой литературы показал эффективность использования для диагностики минимальной остаточной болезни циркулирующих опухолевых РНК, ДНК (метод «жидкой биопсии») при солидных новообразованиях, в том числе при раке молочной железы, как один из объективных методов детекции, в Вашем исследовании выбраны циркулирующие опухолевые клетки? Какова, по Вашему мнению, а также результатам проведенного научного исследования, эффективность применения ЦОК в целях диагностики и мониторинга лечения пациентов с ограниченным локальным опухолевым процессом и их преимущества в клинической практике?

Таким образом, диссертационная работа Шляхтунова Евгения Александровича «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение», направленная на разработку высокочувствительных молекулярно-генетических методов выявления и генотипирования ЦОК, а также на их основе разработку эффективных методов адьювантной цитостатической терапии при РМЖ, является

междисциплинарным, научно обоснованным и перспективным направлением в фундаментальной и клинической онкологии.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту

Научная значимость диссертационной работы Шляхтунова Е.А. заключается в развитии нового научного направления, включающего в себя несколько этапов: первый – разработку методов выявления (диагностики) минимальной остаточной болезни с использованием разработанных соискателем тест-систем, их клинической апробации для идентификации ЦОК. Второй этап состоял в определении молекулярно-генетической экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu* в циркулирующих опухолевых клетках и разработку нового метода адьювантной терапии, направленного на эрадикацию ЦОК в периферической крови у пациенток, страдающих раком молочной железы I-III стадий.

В процессе разработки отечественных диагностических тест-систем соискателем выбран методически правильный и аргументированный подход с применением для выделения РНК из ЦОК двух наборов реагентов различных производителей: технологии AdnaGen AG, Langenhagen, Германия и набора для выделения собственного производства, который включал обогащение и выделение ЦОК с использованием ковалентно-связанных антител для CD326 (EpCAM) на немагнитной полимерной матрице крупных микросфер с последующей изоляцией ЦОК по размеру (ООО «СИВитал, Беларусь»). Таким образом, полученную двумя разными методами РНК и кДНК исследовали двумя разными тест-системами с обязательным выполнением сравнительного анализа. В чем, по Вашему мнению, преимущества выделения ЦОК на немагнитной полимерной матрице крупных микросфер по сравнению с использованием магнитной платформы? Какой из методов выделения позволяет получить неповрежденные опухолевые клетки в большем объеме?

При разработке новых диагностических молекулярно-генетических технологий существенным является объективное установление количества ЦОК в 1 мл забранной периферической крови, которое ассоциировано с распространенностью опухолевого процесса. В выполненном Вами диссертационном исследовании как проведен подсчет количества ЦОК, а также как определялась их принадлежность к опухолевым, а не цитокератин-содержащим клеткам?

В качестве контроля использованы образцы периферической крови здоровых женщин.

В ходе выполнения данного этапа научной работы установлено, что разработанные тест-системы для детекции транскриптов генов *BIRC5*, *HER2-neu* и *c-ABL*, как гена эндогенного контроля, на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени с аналитической чувствительностью более либо равно 5 копиям в пробе и аналитической специфичностью 100%, позволяют определять экспрессию данных генов в циркулирующих опухолевых клетках.

Следует отметить, что в практической работе преимущественно используют в качестве гена «домашнего хозяйства» зарекомендованный многими исследователями *GAPDH*, почему в Вашей работе в качестве эндогенного контроля использовался ген *c-ABL*?

Таким образом, соискателем Евгением Александровичем Шляхтуновым разработаны новые высокочувствительные тест-системы для выявления экспрессии генов *BIRC5*, *HER2-neu* и *c-ABL* в циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы I-III стадий.

Преимущество разработанных новых диагностикумов объективно отражается при расчете экономической эффективности их применения. Экономические расчеты, основанные на анализе соотношения затраты по отношению к предотвращенному ущербу при использовании предлагаемой разработки, показали свою объективную эффективность при выборе патогенетически обоснованной системной терапии.

В настоящее время доказано, что злокачественные опухоли характеризуются молекулярно-генетической гетерогенностью и склонностью к появлению новых клонов опухолевых клеток в процессе ее роста и прогрессирования опухолевого процесса, что представляет значительные трудности при выборе схем специального лечения и снижает его эффективность.

Существует точка зрения, что оценка молекулярно-генетического паттерна циркулирующей опухолевой ДНК, РНК, циркулирующих опухолевых клеток в периферическом кровотоке позволит решить данную проблему.

Особый научный интерес в данной диссертационной работе представляют полученные соискателем данные о молекулярно-генетическом профиле циркулирующих опухолевых клеток у пациенток, страдающих раком молочной железы, до начала специального лечения и при мониторинге адьювантной терапии.

Установлено, что у пациентов, страдающих раком молочной железы со стадиями I-III, циркулирующие опухолевые клетки до начала специального лечения характеризуются разнообразным транскрипционным фенотипом, включающим как растущие, так и стволовые опухолевые клетки, а также

клетки на этапе эпителиально-мезенхимального перехода. При этом наличие циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, до начала специального лечения, а также стадия опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов IIВ–IIIС (N+) и индексом пролиферативной активности опухоли Ki 67 >20% являются независимыми прогностическими факторами риска возврата заболевания.

Впервые определено, что циркулирующие опухолевые клетки, экспрессирующие ген *BIRC5* и ген *HER-2/neu*, обнаруживаются в периферической крови при резектабельном раке молочной железы до начала специального лечения при всех молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы.

Проведенными Евгением Александровичем исследованиями доказано, что после радикального иссечения опухоли, в процессе адъювантного лечения, включающего лучевую терапию, химиотерапию и гормонотерапию у определенного контингента пациентов продолжают диагностироваться ЦОК, что свидетельствует о наличии минимальной остаточной болезни.

Научную новизну, безусловно, имеют данные о изменении транскрипционного генотипа циркулирующих опухолевых клеток на фоне проводимой адъювантной химиотерапии, в том числе и мишень-направленной, что установлено по экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu*. Доказано увеличение клона опухолевых клеток, экспрессирующих ген *BIRC5* и диагностируемая генетическая дивергенция опухолевых клонов с *HER-2/neu* отрицательным статусом в *HER-2/neu* положительный, независимо от стадии опухолевого процесса и молекулярно-биологического подтипа карциномы молочной железы.

Полученные автором данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение, что позволяют их использовать в качестве дополнительных маркеров в оценке эффективности проводимой адъювантной лекарственной терапии. При этом показано, что адъювантная химиотерапия по схеме 4 курса доксорубицин/эпирубицин + циклофосфан с последующим проведением 4-х курсов паклитаксела статистически значимо ($p=0,006$) приводит к снижению частоты обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*.

Согласно выполненным соискателем Евгением Александровичем исследованиям показано, что циркулирующие опухолевые клетки, экспрессирующие гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, обнаруживались статистически значимо чаще ($p=0,001$) при неблагоприятном исходе, что позволяет прогнозировать течение заболевания, провести патогенетически

обоснованную коррекцию адьювантной терапии и повысить скорректированную и безрецидивную выживаемость.

Новым подходом в оценке эффективности проводимой терапии является детекция минимальной остаточной болезни по выявлению ЦОК, а также разработка на этой основе эффективных методов адьювантной цитостатической химиотерапии, направленных на полную эрадикацию ЦОК в периферической крови.

Предложенный новый метод лечения минимальной остаточной болезни, включающий ранний переход с антрациклинсодержащих схем, при установлении факта их неэффективности после 2 курсов химиотерапии, на таксаны (4 курса лекарственного средства паклитаксел), с последующим переходом на гемцитабин при сохранении циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, позволяют добиться 100% их эрадикации. При этом данный режим терапии позволяет статистически значимо увеличить скорректированную 5-летнюю выживаемость на 11,6% ($p=0,036$) до $90,3\pm 3,8\%$ (95% ДИ: 86,5–94,1), а безрецидивную выживаемость на 7,4% ($p=0,023$) до $88,0\pm 4,4\%$ (95% ДИ: 83,6–92,4) по сравнению со стандартными режимами адьювантной терапии.

Таким образом, соискателем Шляхтуновым Е.А. полученные новые данные позволили аргументированно сформулировать 6 научных положений, вынесенных на защиту.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Представленный в диссертационном исследовании дизайн научной работы, корректно сформированные группы исследования, использование современных молекулярно-генетических методов детекции, применение современных пакетов статистической обработки полученных результатов не вызывают сомнений в объективности и достоверности полученных автором результатов и выводов, обоснованности предлагаемых клинической практике рекомендаций.

Выполненное диссертационное исследование включало три последовательных спланированных этапа: разработка тест-систем для идентификации ЦОК; проспективное сплошное нерандомизированное исследование с целью изучения транскрипционного генотипа ЦОК; установления их клинического и прогностического значения, изучения и оценки эффективности методов терапии РМЖ (хирургическая операция, ПХТ, ЛТ, ГТ) в отношении эрадикации ЦОК и контроля МОБ; проспективное контролируемое (псевдорандомизированное) исследование, организованное

по принципу адаптивной рандомизации, проведенное при оптимизации адъювантной терапии РМЖ осуществлялось с учетом МОБ и сравнением СВ и БРВ в тестируемой и контрольной группах.

Полученные данные обработаны с применением современных статистических методов, включающих описательную статистику (параметрическую и непараметрическую), кластерный анализ и многофакторный анализ по Коксу.

Исследование основано на анализе данных, полученных в ходе исследования биологического материала и клинических данных 230 онкологических пациентов, страдающих первичным резектабельным раком молочной железы: 162 женщины проспективного сплошного исследования и 68 – тестируемой группы (контролируемого псевдорандомизированного исследования), а также 52 неонкологических пациентов группы контроля. Сформулированные выводы, положения диссертации и рекомендации, сделанные на основании полученных данных, обоснованы, аргументированы, являются логичными и достоверными.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость диссертационной работы соискателя заключается в разработке новых подходов в лечении минимальной остаточной болезни при раке молочной железы на основе выявления молекулярно-генетической дивергенции циркулирующих опухолевых клеток, методах их выявления, что позволило получить новые углубленные знания об опухолевом процессе как системном заболевании, процессах метастазирования и диссеминации.

Научно-практическая значимость диссертационной работы определяется разработкой и обоснованием необходимости определения минимальной остаточной болезни по экспрессии тканеспецифических генов в циркулирующих опухолевых клетках в периферическом кровотоке с целью контроля эффективности противоопухолевой терапии на этапах адъювантного лечения рака молочной железы, полной эрадикации опухолевых клеток под воздействием различных химиотерапевтических агентов и своевременным переходом на более эффективные схемы лечения.

Научная новизна работы подтверждена 2 патентами Республики Беларусь на изобретение.

При выполнении научно-исследовательской работы соискателем изучен транскрипционный фенотип циркулирующих опухолевых клеток, доказана его молекулярно-генетическая гетерогенность, ассоциированная с активным

клеточным ростом, активацией эпителиально-мезенхимального перехода, появлением клона стволовых опухолевых клеток у пациентов, страдающих раком молочной железы I–III стадий.

Автором доказано, что у пациентов, страдающих раком молочной железы I–III стадий, сохранение циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, при всех молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы, после завершения адъювантного лечения, включающего лучевую терапию, химиотерапию и гормонотерапию, является независимым фактором риска возврата заболевания, что позволяет использовать данные циркулирующие опухолевые клетки как критерий в оценке минимальной остаточной болезни.

Особую актуальность и значимость в научно-практическом аспекте имеют данные, доказывающие, что под воздействием проводимой адъювантной химиотерапии, в том числе и таргетной, не зависимо от стадии опухолевого процесса и молекулярно-биологического подтипа карциномы молочной железы происходит изменение транскрипционного фенотипа циркулирующих опухолевых клеток в сторону преобладания *BIRC5* и *HER-2/neu* положительных клонов, что позволяет рассматривать данные гены, а именно их экспрессию в ЦОК как дополнительные маркеры эффективности проводимой адъювантной терапии. При этом впервые установлено, что адъювантная химиотерапия по схеме 4 курса доксорубицин+циклофосфан с последующим проведением 4-х курсов паклитаксела значимо приводит к снижению частоты обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*.

Несомненную практическую значимость имеют результаты, показывающие, что выявление циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, до начала специального лечения, а также стадия опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов II–III (N+) и индексом пролиферативной активности опухоли Ki 67 >20% являются независимыми прогностическими факторами риска возврата заболевания, показателем эффективности адъювантной терапии и улучшения бессобытийной и опухолеспецифической выживаемости.

Результаты научных исследований Е.А. Шляхтунова, посвященные оптимизации адъювантной полихимиотерапии у пациентов промежуточного и высокого риска возврата заболевания, направленные на патогенетически обоснованный переход с антрациклинсодержащих схем при установлении их неэффективности на основе оценки экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu* в циркулирующих опухолевых клетках на таксаны с последующим переходом

на гемцитабин, позволяющий добиться 100% эрадикации ЦОК представляют как практическую, так и социальную значимость. Вместе с тем возникает вопрос, какие объективные инструментальные методы обследования использовались для оценки эффективности применения таксанов в программах лечения пациентов промежуточного и высокого риска возврата заболевания?

Практическую значимость работы также подтверждают впервые созданные автором диагностические наборы для определения экспрессии генов *BIRC5*, *HER2-neu*, *c-ABL* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в циркулирующих опухолевых клетках, обладающие аналитической чувствительностью более либо равно 5 копиям в пробе, аналитической специфичностью – 100%.

Социальная значимость работы состоит в увеличении выживаемости и повышении качества жизни пролеченных пациентов. Применение разработанных автором методов позволяет значимо увеличить скорректированную 5-летнюю выживаемость на 11,6% ($p=0,036$) до $90,3\pm 3,8\%$ (95% ДИ: 86,5–94,1), а безрецидивную выживаемость на 7,4% ($p=0,023$) до $88,0\pm 4,4\%$ (95% ДИ: 83,6–92,4) с экономической эффективностью 11,8.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

По теме диссертационного исследования опубликовано 47 научных работ. Из них две монографии объемом 23,4 авторского листа, 15 статей в научных журналах, входящих в перечень ВАК Республики Беларусь, 7 статей в зарубежных изданиях общим объемом 8,9 авторского листа. В сборниках научно-практических конференций опубликовано 19 статей, в том числе 11 англоязычных. Результаты научно-исследовательской работы доложены на конференциях стран СНГ – 3, конференциях и симпозиумах за рубежом – 8.

Утверждены и изданы 2 инструкции по применению. Получено 2 патента на изобретение, а также 3 регистрационных удостоверения на разработанные тест-системы.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Оформление диссертационной работы «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение» соответствует требованиям, установленным законодательством.

Цель, 7 задач исследования, 6 научных положений, вынесенных на защиту, 7 выводов конкретно сформулированы и отражают основное содержание работы.

Диссертационная работа включает в себя введение, общую характеристику работы, аналитический обзор литературы, материал и методы исследования и 6 глав с описанием проведенных исследований и полученных результатов, заключение, выводы, библиографический список, включающий 432 источника литературы, список публикаций соискателя, приложения. Диссертация изложена на русском языке, иллюстрирована 95 таблицами, 57 рисунками. Общий объем диссертации составляет 304 страницы.

Во введении автором изложены основные вопросы, отражающие актуальность и нерешенные проблемы в повышении эффективности лечения рака молочной железы как системного заболевания, решение которых представляет, в целом, актуальную проблему для практического здравоохранения.

В детальном аналитическом обзоре литературы приведены актуальные современные сведения о циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы, их характеристика с использованием различных методов исследования, как у пациентов, так на экспериментальных моделях опухолей на животных и культуре опухолевой ткани. Детально изложены потенциальные механизмы образования метастазов из циркулирующих опухолевых клеток. Освещены возможные механизмы резистентности этих клеток к проводимой противоопухолевой терапии и возможные пути преодоления последней. Изложены вопросы и проблемы связанные со сложностью обогащения, выделения и изоляции ЦОК. Также автор приводит информацию о способах и методах терапии при МОБ. Следует отметить, что автор подводит черту под этой главой проведя мета-анализ опубликованной литературы, где подчеркивается актуальность решаемой им проблемы, и определяет пути ее решения, принимая во внимание спорные моменты в данной области.

Во второй главе «Материалы и методы» приведены сведения о дизайне исследования, контингенте пациенток, клинические критерии включения и исключения пациенток в исследование, распределение их по возрасту, стадиям заболевания, морфологическим типам и степени дифференцировки опухоли, молекулярно-биологическим подтипам. Подробно описаны применяемые методы исследования, включая технологию обогащения, выделения и изоляции ЦОК, используемые диагностические наборы и тест-системы, а также способы оценки экспрессии исследуемых генов. Представлены схемы лечения пациентов опытной и тестируемой подгрупп. Детально описаны методы и способы статистической обработки полученных данных.

Результаты, полученные в ходе выполнения работы, изложены в последующих главах диссертации.

В третьей главе, посвященной разработке тест-систем для идентификации ЦОК подробно описаны этапы разработки тест-систем для оценки экспрессии генов *HER2-neu*, *BIRC5*, *c-ABL*, включая подбор и дизайн праймеров, оптимизацию протокола амплификации и интерпретации результатов. В главе приводится сравнительный анализ двух технологий обогащения, изоляции и выделения ЦОК: иммуномагнитной сепарации и более приемлемой технологии на основе полимерных микросфер с антительным покрытием к CD 326/ErCAM и последующей изоляцией по размеру клеток. Также в данной главе представлены результаты клинической апробации разработанных тест-систем для оценки экспрессии генов *BIRC5* и *HER-2/neu* методом ОТ-ПЦР в ткани первичной карциномы и ЦОК.

Четвертая глава посвящена исследованию транскрипционного генотипа ЦОК у пациентов, страдающих резектабельным раком молочной железы, до начала специального противоопухолевого лечения. Представлены данные о частоте экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu*, генов эпителиально-мезенхимального перехода *TWIST*, *PI3K*, *AKT2*, гена стволовых клеток *ALDH1*. Важные результаты получены по экспрессии генов суперсемейства ABC-транспортеров, позволившие определить чувствительность опухолевых клеток к системной терапии. Проведенный корреляционный и кластерный анализы позволили выявить закономерности в экспрессии различных генетических сигнатур.

В пятой главе приводятся результаты исследований, отражающие эффективность радикальной хирургической операции в отношении ЦОК.

Шестая глава посвящена результатам исследований, отражающих эффективность проводимой адьювантной противоопухолевой терапии: системной адьювантной лекарственной терапии, лучевой терапии и гормонального лечения в эрадикации ЦОК и контроля над минимальной остаточной болезнью. В заключении данной главы приводится наиболее эффективная схема противоопухолевой терапии в отношении эрадикации ЦОК.

Седьмая глава посвящена прогностической и предиктивной роли ЦОК. В главе представлены результаты оценки выживаемости пациентов с учетом наличия ЦОК после терапии, транскрипционного генотипа ЦОК. В данной главе приводятся результаты многофакторного анализа по Коксу, благодаря которому удалось выделить независимые прогностические факторы риска возврата болезни. К неблагоприятным факторам относятся наличие в периферической крови ЦОК до начала специального лечения,

экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1*, стадия опухолевого процесса (с поражением или без такового регионарных лимфатических узлов), индекс пролиферативной активности первичной карциномы Ki 67, а также сохранение ЦОК (МОБ) после завершения противоопухолевой терапии. Показано, что у пациентов, имеющих все четыре неблагоприятных фактора, условная вероятность смерти в 44,3 выше, чем у пациентов, у которых эти факторы отсутствуют.

В восьмой главе изложена методика оптимизации адъювантной терапии РМЖ с учетом МОБ, так называемая ЦОК-ориентированная терапия и ее клиническая апробация на тестируемой подгруппе пациентов. В ходе выполнения научного исследования установлено, что применение метода лечения МОБ, основанного на своевременном переходе с неэффективной схемы адъювантной ПХТ на таксаны, а также дополнительная монокимиотерапия гемцитабином у пациентов промежуточного и высокого риска возврата болезни, позволяют добиться 100% эрадикации положительных ЦОК в периферической крови, что дает возможность статистически значимо увеличить скорректированную 5-летнюю выживаемость на 11,6% ($p=0,036$) до $90,3\pm 3,8\%$ (95% ДИ: 86,5–94,1), а безрецидивную выживаемость на 7,4% ($p=0,023$) до $88,0\pm 4,4\%$ (95% ДИ: 83,6–92,4) с экономической эффективностью 11,8.

В каждой главе обобщаются полученные данные с формулировкой выводов. Заключение диссертационной работы состоит из семи обоснованных выводов.

Приложения подтверждают практическую значимость работы и представлены техническими условиями на производство тест-систем, регистрационными удостоверениями, отчетами по клиническим испытаниям, копиями инструкций по применению и актами внедрения в лечебную деятельность учреждений здравоохранения республики и учебный процесс учреждений высшего медицинского образования, патентами на изобретения.

Автореферат диссертации полностью отражает содержание работы.

В ходе анализа выполненной диссертационной работы возникли вопросы:

1. Мета-анализ мировой литературы показал эффективность использования для диагностики минимальной остаточной болезни циркулирующих опухолевых РНК, ДНК (метод «жидкой биопсии») при солидных новообразованиях, в том числе при раке молочной железы, как один из объективных методов детекции, в Вашем исследовании выбраны циркулирующие опухолевые клетки? Какова, по Вашему мнению, а также результатам проведенного научного исследования, эффективность

применения ЦОК в целях диагностики и мониторинга лечения пациентов с ограниченным локальным опухолевым процессом и их преимущества в клинической практике?

2. В чем, по Вашему мнению, преимущества выделения ЦОК на немагнитной полимерной матрице крупных микросфер по сравнению с использованием магнитной платформы? Какой из методов выделения позволяет получить неповрежденные опухолевые клетки в большем объеме?

3. При разработке новых диагностических молекулярно-генетических технологий существенным является объективное установление количества ЦОК в 1 мл забранной периферической крови, которое ассоциировано с распространенностью опухолевого процесса. В выполненном Вами диссертационном исследовании как проведен подсчет количества ЦОК, а также как определялась их принадлежность к опухолевым, а не цитокератин-содержащим клеткам?

4. В практической работе преимущественно используют в качестве гена «домашнего хозяйства» зарекомендованный многими исследователями *GAPDH*, почему в Вашей работе в качестве эндогенного контроля использовался ген *c-ABL*?

5. Какие объективные инструментальные методы обследования использовались для оценки эффективности применения таксанов в программах лечения пациентов промежуточного и высокого риска возврата заболевания? Имелись ли подтверждающие данные за возврат заболевания с использованием двух методических подходов?

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Анализ материалов, представленных Шляхтуновым Е.А., свидетельствует о том, что соискатель является высококвалифицированным специалистом, полностью владеет данными современной мировой литературы по рассматриваемой проблеме, объективно и аргументированно проводит анализ полученных результатов и на высоком уровне выполнил научную работу. Высокий уровень подготовки соискателя позволил обосновать тему научного исследования, сформулировать задачи и положения, выносимые на защиту, выполнить обработку полученных данных, сформулировать выводы и практические рекомендации. Содержание опубликованных работ не оставляет сомнений о широком кругозоре и личном вкладе соискателя в науку.

Таким образом, научная квалификация Шляхтунова Е.А. соответствует степени доктора медицинских наук, на которую он претендует, что подтверждается достаточным количеством научных публикаций по теме

диссертации и докладов на научных форумах, внедрениями результатов работы в практическое здравоохранение, использованием современных методов исследования и анализа материала, высоким качеством проведенной работы.

Заключение

Диссертационная работа Е.А. Шляхтунова «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология, является завершенным, самостоятельно выполненным научным исследованием, содержащим принципиально новые достоверные результаты, свидетельствующие о существенном вкладе их в решении научной проблемы, а именно: повышение эффективности лечения пациенток, страдающих раком молочной железы.

Диссертационная работа соответствует пункту 20 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», а ее автор, Шляхтунов Евгений Александрович, заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – онкология за:

– разработку оригинальных тест-систем для оценки экспрессии генов *BIRC5*, *HER2-neu* и *c-ABL* в циркулирующих опухолевых клетках методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с аналитической чувствительностью более либо равно 5 копиям в пробе, аналитической специфичностью – 100%.

– выявление минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих раком молочной железы, по определению циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови разработанными тест-системами методом ОТ-ПЦР;

– доказательство генетической гетерогенности циркулирующих опухолевых клеток у пациентов, страдающих неметастатическим раком молочной железы, до начала специального лечения, что в 48,4% случаев характеризуется экспрессией гена *BIRC5*, гена *HER-2/neu*, маркеров эпителиально-мезенхимального перехода – в 74% случаев, маркера стволовой опухолевой клетки *ALDH1* – в 46,4%;

– установление прогностической значимости риска возврата заболевания по стадии опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов IIВ–IIIС (N+) с повышением риска прогрессирования в 3,8 раза (95% ДИ: 1,59–9,34), Ki 67 >20%, увеличивающим риск в 2,7 раза (95% ДИ: 1,04–6,82), наличию ЦОК, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки *ALDH1* до начала специального лечения с возрастанием риска возврата

в 1,2 раза (95% ДИ: 1,07–7,73), сохранение ЦОК (МОБ) после завершеного противоопухолевого лечения, что увеличивает риск рецидива болезни в 3,6 раза (95% ДИ: 1,32–9,99);

– доказательства наличия циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, экспрессирующих гены *BIRC5* и *HER-2/neu*, при резектабельном раке молочной железы до начала специального лечения при всех молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы с частотой 70,9%, после хирургического лечения – в 59,1%, в процессе адъювантного лечения, включающего лучевую терапию, химиотерапию и гормонотерапию с частотой до 40,7%, что позволяет использовать определение циркулирующих опухолевых клеток в качестве критерия оценки минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих раком молочной железы I–III стадии;

– установление генетической дивергенции циркулирующих опухолевых клеток на фоне проводимой адъювантной химиотерапии с преобладанием клонов с высоким уровнем экспрессии генов *BIRC5* (4,537, $p=0,01$), *HER-2/neu* положительных клонов ($p=0,011$) независимо от стадии опухолевого процесса и молекулярно-биологического подтипа карциномы молочной железы;

– доказательство эффективности адъювантной химиотерапии по схеме 4 курса доксорубицин+циклофосфан с последующим проведением 4-х курсов паклитаксела, которая статистически значимо ($p=0,006$) приводит к снижению частоты обнаружения циркулирующих опухолевых клеток и позволяет осуществлять контроль над минимальной остаточной болезнью;

– разработку нового метода контроля эффективности адъювантной цитостатической химиотерапии пациентов, страдающих раком молочной железы, на основе оценки экспрессии генов *BIRC5*, *HER-2/neu* в циркулирующих опухолевых клетках, позволяющего в ранние сроки установить неэффективность проводимой адъювантной терапии по схеме CAF (CEF) у 56,1%, схеме AC (EC) – у 52,5%, схеме AC-T – у 16%, по схеме T-Траст – у 25% и при гормонотерапии – у 44,1% пациентов;

– разработку нового метода адъювантной цитостатической химиотерапии, включающего ранний переход с антрациклинсодержащих схем, при установлении факта их неэффективности после 2 курсов химиотерапии, на таксаны (4 курса лекарственного средства паклитаксел), с последующим переходом на гемцитабин при сохранении циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, что позволяет добиться максимальной эрадикации циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови, статистически значимо увеличить 5-летнюю скорректированную выживаемость на 11,6% ($p=0,036$) до 90,3±3,8%, а

безрецидивную выживаемость на 7,4% ($p=0,023$) до $88,0\pm 4,4\%$ с экономической эффективностью 11,8.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий клинико-диагностической
лабораторией государственного учреждения
здравоохранения «Минский областной
клинический госпиталь инвалидов Великой
Отечественной войны имени П.М. Машерова»

Р.М. Смолякова

17.10.2022



Познесса удостоверю *Анна Валерьевна*