

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор ФГАОУ ВО

РНИМУ

им. Н.И. Пирогова

Минздрава России

По научной работе

д.б.н., профессор РАН

Д.В. Ребриков

2022 г.



## **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

**федерального государственного автономного образовательного учреждения  
высшего образования "Российский национальный исследовательский  
медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
о научно-практической значимости диссертации  
Суспицына Евгения Николаевича  
«Молекулярная диагностика наследственных заболеваний,  
ассоциированных с повышенным риском возникновения опухолей»,  
представленной на соискание ученой степени доктора медицинских наук  
по специальностям:**

**3.1.6. - онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика.**

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Общее число известных заболеваний генетической природы в настоящее время достигает 6000-7000 и продолжает ежегодно увеличиваться. Несмотря на то, что по отдельности большинство наследственных болезней встречаются достаточно редко, в совокупности они могут быть причиной нарушения здоровья значительной части населения планеты. Только в России число пациентов с

наследственными патологиями по приблизительным оценкам достигает 8-11 млн. человек.

Очень часто наличие наследственного дефекта увеличивает риск развития опухолей, в том числе, злокачественных – способных привести к гибели пациента. Иногда развитие новообразований является единственным клиническим проявлением заболевания: это справедливо, например, для наследственного рака молочной железы и яичников или для наследственного неполипозного рака толстой кишки (синдрома Линча). В других случаях на первый план выходят иные симптомы – например, задержка психоречевого развития, уязвимость к инфекциям, наличие пятен на коже и т.д., однако наряду с этим отмечается и повышенный риск появления опухолей. В частности, дети с первичными иммунодефицитами часто страдают злокачественными новообразованиями; особенно высок риск развития новообразований у пациентов с наследственными дефектами ДНК-репарации. Своевременная диагностика подобных состояний необходима для организации соответствующих профилактических программ.

Однако генетическим заболеваниям свойственен ряд особенностей, которые отличают их от широко распространенных мультифакториальных болезней. К таким особенностям можно отнести наследование в соответствии с законами Менделя, генетическую гетерогенность (существование большого числа генов, связанных с определенным фенотипом), а также значительные географические колебания в отношении спектра мутаций (болезнь, исключительно редкая в одной стране, может быть очень частой в другой).

Некоторые этнические группы характеризуются выраженным «эффектом основателя», что позволяет проводить экономически эффективный скрининг наследственных заболеваний. Например, в Финляндии два повторяющихся варианта гена MLH1 ответственны за развитие более половины случаев синдрома Линча. У представителей славянских народов, в том числе у русских, также выявлен ряд founder-вариантов, ассоциированных с моногенными заболеваниями.

Диссертационное исследование Е.Н. Суспицына посвящено выявлению особенностей российского генофонда в отношении генетических детерминант

заболеваний, связанных с риском развития опухолей, а также оптимизации процесса молекулярно-генетической диагностики ряда болезней этой обширной и гетерогенной группы. Актуальность проблем, поднятых в работе, не вызывает сомнения.

### **Научная новизна**

Результаты исследования обладают значительной степенью новизны.

Описан спектр молекулярно-генетических повреждений у пациентов с наследственным неполипозным раком толстой кишки (синдромом Линча). Несмотря на то, что несколько аналогичных работ уже опубликовано, результаты исследования расширяют существующий объем знаний по данной проблеме: в частности, впервые в России описана частота крупных перестроек генов MLH1 и MSH2. Показано, что, в отличие от наследственного рака молочной железы и яичников, для российских пациентов с синдромом Линча эффект основателя выражен в незначительной степени.

Охарактеризован спектр молекулярно-генетических повреждений у российских пациентов с синдромом Пейтца-Егерса. Количество генетически подтвержденных случаев этого заболевания, не превышает нескольких десятков, что подчеркивает ценность представленных автором наблюдений. В частности, выявлены крупные делеции гена STK11.

Изучению наследственных форм рака молочной железы (РМЖ) посвящено множество научных работ, однако не менее чем в половине случаев РМЖ с явными признаками наследственного рака генетическая причина остается неизвестной. В результате целенаправленного поиска дефектов генов репарации ДНК в группе пациенток с признаками наследственного рака молочной железы автором выявлен повторяющийся аллель гена BLM; носительство данного варианта повышает риск развития РМЖ более чем в шесть раз.

Впервые описаны клиничко-морфологические особенности опухолей молочной железы, возникающих на фоне наследственного дефекта BLM

Несмотря на растущее внимание к проблеме туберозного склероза (ТС), сведения о молекулярно-генетических характеристиках российских пациентов по-прежнему не обладают должной полнотой. Настоящее исследование вносит свой вклад в каталогизацию молекулярных повреждений TSC1 и TSC2. Сильной стороной работы является тщательное изучение корреляций генотипа и фенотипа. Установлено, что у российских пациентов с туберозным склерозом имеется ряд особенностей, например, абсолютное преобладание спорадических форм заболевания над семейными, а также повышенная частота крупных перестроек TSC2. Показано, что пациенты, у которых не было выявлено мутаций TSC1 и TSC2, представляют собой особую группу в отношении клинических признаков заболевания, характеризующуюся более благоприятным течением.

Высокой степенью научной новизны обладает раздел исследования, посвященный первичным иммунодефицитам (ПИД). Выявлен широкий спектр дефектов различных звеньев иммунной системы, а также ряд повторяющихся патогенных аллелей, продемонстрированы возможности таргетного мультигенного секвенирования в диагностике ПИД. Особый акцент в работе сделан на синдромы с хромосомной нестабильностью (атаксия-телеангиэктазия, синдром Блума), для которых характерен наиболее значительный риск развития неоплазм. Проведено систематическое исследование молекулярно-генетических особенностей российских пациентов с атаксией-телеангиэктазией; показано существование в России выраженного «эффекта основателя» в отношении атаксии-телеангиэктазии. Описаны нетипичные клинические особенности у больных синдромом Блума, гомозиготных по «славянской» мутации BLM p.Q548\*.

Получен патент на изобретение № RU2755538C1 от 17.09.2021 «Способ синтеза наборов олигонуклеотидов для ампликонного таргетного секвенирования», предлагающий новый экономичный способ целевого обогащения последовательностей ДНК с целью их дальнейшего анализа посредством высокопроизводительного секвенирования.

**Степень обоснованности и достоверности положений, выводов,**

### **заклучений и рекомендаций**

Диссертация является завершенным многолетним научным исследованием, выполненным на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и включающим анализ большого массива данных (проанализированы сведения о 5500 пациентов с редкими заболеваниями). Научные положения диссертации соответствуют пунктам паспорта научных специальностей 3.1.6. - онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика. Работа носит ярко выраженный трансляционный характер, демонстрируя взаимосвязь онкологии и медицинской генетики.

Достоверность результатов проведенного исследования обеспечивается достаточным объемом исследуемых выборок, использованием современных молекулярно-генетических методов и статистических методов обработки полученных данных. Генетические термины использованы корректно.

Все этапы диссертационного исследования, включая формулировку целей, и задач, создание регистра пациентов, обработку данных историй болезни и результатов высокопроизводительного секвенирования, а также обобщение полученных результатов, выполнены лично автором. Выводы логичны и научно обоснованы, практические рекомендации конкретны и представляются легко реализуемыми.

Самостоятельно выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме работы, непосредственно лабораторные исследования, а также статистическая обработка полученных результатов. Массивное параллельное секвенирование нового поколения (анализ таргетных панелей и экзомов), включая биоинформатическую обработку, выполнено совместно с коллективом научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Наличие у автора специализации в области клинической генетики, а также многолетнего опыта практического консультирования больных позволило ему лично провести описание фенотипов пациентов с редкими заболеваниями.

Основные результаты диссертации регулярно представлялись на научных мероприятиях в России и за ее пределами.

По теме исследования опубликовано 52 научные работы, 48 из которых относятся к изданиям, рекомендованным перечнем ВАК РФ. 22 статьи выпущены в журналах, принадлежащих квинтилю Q1, также опубликована глава в монографии, посвященной туберозному склерозу и 82 тезиса в материалах отечественных и зарубежных конференций.

Получен патент на изобретение (№2755538 от 17.09.2021).

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

Работа является комплексным многоплановым исследованием, в ходе которого получены новые для изучаемой области знаний результаты. Проведено исследование частоты и спектра мутаций, приводящих к развитию наследственного неполипозного рака толстой кишки (синдром Линча) и разновидности наследственного полипоза ЖКТ (синдром Пейтца-Егерса) у российских пациентов. Выявлена новая генетическая детерминанта наследственного рака молочной железы – «славянская» нонсенс-мутация гена BLM. Обнаружена высокая популяционная частота этого аллеля, что свидетельствует о целесообразности выявления его носительниц с целью формирования групп повышенного риска РМЖ.

Продемонстрировано, что тестирование повторяющихся патогенных вариантов позволит оптимизировать процесс ДНК-диагностики наследственного рака молочной железы, синдрома Блума и атаксии-телеангиэктазии в Российской Федерации. Получены новые сведения о клинико-генетических особенностях российских пациентов с туберозным склерозом. В частности, показано, что пациенты, у которых не было выявлено мутаций в генах TSC1 и TSC2, представляют собой особую группу в отношении клинических проявлений заболевания: для них характерны более поздний возраст на момент диагноза, отсутствие гамартом головного мозга (кортикальных туберов и субэпендимальных узлов), а также редкая частота эпилепсии.

Разработаны критерии отбора пациентов с рекуррентными инфекциями для генетического исследования, позволяющие повысить эффективность выявления патогенных мутаций в генах системы иммунитета. Создана и апробирована таргетная мультигенная панель, направленная на ДНК-диагностику большинства известных на данный момент нозологических форм первичных иммунодефицитов.

Впервые в России приведены сведения о генетически-подтвержденных случаях редкого синдрома с хромосомной нестабильностью (синдром Блума). Описана нетипичная клиническая картина этого заболевания (отсутствие характерной лицевой эритемы) у пациента, гомозиготного по рекуррентной «славянской» мутации BLM, чем, по-видимому, объясняется несоответствие между ожидаемой расчетной частотой гомозигот и реальным числом диагностированных случаев.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты и выводы диссертационной работы Суспицына Евгения Николаевича могут быть использованы в деятельности ЛПУ, оказывающих помощь онкологическим больным, а также в учреждениях медико-генетической службы.

Результаты исследования и разработанные диагностические методики внедрены в практическую деятельность научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (акт о внедрении 27.07.2022).

Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры общей и молекулярной медицинской генетики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

#### **Общая характеристика работы, достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации**

Научно-исследовательская работа изложена на 277 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Работа проиллюстрирована 9 рисунками и 24 таблицами. Библиографический указатель содержит 483 источника, из них 60 отечественных и 423 зарубежных.

Введение содержит информацию об актуальности и необходимости проведения данного исследования.

Обзор литературы посвящен общей характеристике орфанных заболеваний и современным технологиям их диагностики, а также описанию конкретных клинических групп и отдельных нозологий. Автор систематизирует сведения о спектре наследственных синдромов, для которых характерна предрасположенность к развитию опухолей, в частности, приводит данные о их распространенности в различных регионах России.

Разделы 1.3–1.6 посвящены конкретным нозологиям (синдром Линча, синдром Пейтца-Егерса, наследственный рак молочной железы, туберозный склероз). Отдельный раздел (1.7) посвящен патогенетической взаимосвязи между первичными иммунодефицитными состояниями и новообразованиями.

В каждом из разделов рассматриваются гены, повреждения которых приводят к развитию соответствующих заболеваний, функции белков-продуктов и их участие в сигнальных каскадах, клинические признаки, характерный спектр опухолевых проявлений и особенности морфологических характеристик новообразований, существующие подходы к ДНК-диагностике, а также степень изученности проблемы в нашей стране. Наряду с изложением конкретных фактов, полученных разными научными коллективами, обсуждаются актуальные и перспективные направления биомедицинской науки

В главе «Материалы и методы» представлена общая характеристика клинического материала, приведены схемы, иллюстрирующие дизайн исследований. Работа выполнена на более чем достаточных по величине группах больных (2289 пациентов с подозрением на синдром Линча, 1498 пациенток с



раком молочной железы, 61 пациент с туберозным склерозом, 409 больных с клиническими признаками первичного иммунодефицита и т.д.), четко изложены критерии набора пациентов. Для решения поставленных задач использован адекватный арсенал современных молекулярно-генетических технологий (секвенирование по Сэнгеру, мультиплексная лигазозависимая амплификация, таргетное и полноэкзомное секвенирование, аллель - специфическая ПЦР в режиме реального времени, иммуногистохимический анализ и т.д.).

Глава 3 посвящена результатам собственных исследований.

Описана последовательность работы по выявлению наследственных дефектов в системе репарации неспаренных оснований (MMR): отбор пациентов с клиническими признаками синдрома Линча, анализ опухолевой ткани на предмет наличия микросателлитной нестабильности, поиск наследственных мутаций в образцах крови. Проведено сравнение эффективности двух разных диагностических подходов (секвенирование по Сэнгеру + MLPA и таргетное NGS-секвенирование + MLPA). Отмечено, что эффективность выявления наследственных мутаций генов MMR у пациентов с MSI-положительными опухолями толстой кишки значительно выше, чем у больных с MSI-положительными карциномами эндометрия ( $p = 0,023$ ). Повторяющиеся варианты генов MMR редко встречаются у российских пациентов с синдромом Линча; только два варианта, MLH1 с.677G>T и MSH2 с.1906G>C, обнаружены у двух и более индивидуумов. В то же время, в 10,5% случаев обнаруживались крупные перестройки MLH1 и MSH2, что свидетельствует об обязательности использования метода MLPA в процессе диагностики.

Наследственные мутации STK11 выявлены у 80% пациентов с клиническими признаками синдрома Пейтца-Егерса. В то же время наличие повторяющихся патогенных вариантов в этом гене нехарактерно для российских пациентов.

Секвенирование кодирующей последовательности гена BLM в группе высокого генетического риска (пациентки с выраженными признаками наследственного рака молочной железы) позволило выявить повторяющийся патогенный аллель BLM с.1642C>T (p.Q548\*) (славянская founder-мутация).

Частота этой мутации в группе пациентов с РМЖ многократно превышает популяционную, что демонстрирует ассоциацию с высоким риском развития рака молочной железы.

Уникальным является описание клинико-морфологических и генетических характеристик карцином молочной железы, возникающих на фоне наследственного дефекта BLM.

При исследовании пациентов с туберозным склерозом частота выявления мутаций TSC1 и TSC2, а также спектр повреждений в этих генах в целом соответствует данным, полученным другими научными группами. При этом необычно высокая доля мутаций представлена крупными перестройками TSC2. Описано значительное число повторяющихся аллелей TSC2 возникших *de novo*. Проведен анализ клинических и морфологических характеристик больных. У российских пациентов наблюдается доминирование спорадических форм; процент семейных случаев существенно ниже по сравнению с данными других авторов (5% против 11–38%).

Показано, что для больных ТС без выявленных мутаций TSC1/2 характерно более лёгкое течение заболевания: манифестация заболевания во взрослом возрасте, а также отсутствие гамартром головного мозга; в то же время, некоторые проявления ТС (лимфангиолейомиоматоз легких) встречаются исключительно в этой группе.

Важным и интересным представляется глава, посвященная результатам исследований первичных иммунодефицитных состояний (ПИД). Использование даже самых современных методов генетического анализа позволяет установить диагноз первичного иммунодефицита лишь у каждого пятого ребенка с клиническими признаками ПИД. Показано, что эффективность таргетного секвенирования можно повысить путем использования более строгих критериев, отбора – например, 10 признаков возможного ПИД, предложенных Jeffrey Modell Foundation.

В группе пациентов с клиническими признаками атаксии-телеангиэктазии (АТ) мутации гена ATM были выявлены у 100% обследованных, что свидетельствует о надежности существующих критериев этого заболевания. Выявлены три

«мажорных» варианта, наиболее часто встречающиеся у российских пациентов с АТ.

Еще один синдром хромосомной нестабильности, попадающий в сферу интересов автора, это синдром Блума. Впервые в России описаны клинические особенности больных с генетически подтвержденным диагнозом. Результаты свидетельствуют о нетипичном (неполном) фенотипе пациентов, гомозиготных по ранее выявленной славянской founder-мутации. Раздел 3.4.5. посвящен оценке популяционной частоты некоторых патогенных вариантов, ассоциированных с развитием ПИД.

Глава «Заключение» содержит осмысление значения полученных данных. Выводы диссертации логически вытекают из результатов исследования и полностью соответствуют сформулированным целям и задачам. Практические рекомендации обоснованы и реалистичны. Очерчены перспективны дальнейшей разработки темы. Список использованных источников актуален и дает возможность в полном объеме оценить масштабы рассматриваемых вопросов. Ссылки, приведенные в тексте, соответствуют списку литературы.

Автореферат отражает основные положения диссертации, хорошо иллюстрирован и оформлен в соответствии с требованиями.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению автореферата и диссертации нет. В тексте диссертации содержатся опечатки, что не влияет на положительную оценку представленной работы.


## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Суспицына Евгения Николаевича «Молекулярная диагностика наследственных заболеваний, ассоциированных с повышенным риском возникновения опухолей», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 3.1.6. - онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика, является законченной научно-квалификационной работой, решающей актуальную научную проблему оптимизации ДНК-диагностики редких заболеваний, для которых характерен высокий риск развития новообразований.

По своей актуальности, научной новизне, объему и уровню выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, работа соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, ред. от 01 октября 2018 г. № 1168, ред. от 20.03.2021 № 426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор заслуживает присуждения ему искомой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.1.6. - онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика.

Отзыв на диссертацию Суспицына Евгения Николаевича обсужден и одобрен на совместном заседании кафедр ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол №\_3\_ от \_15.11.2022\_).

Заведующий кафедрой онкологии  
и лучевой терапии ЛФ  
доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАН  
(специальность 3.1.6 онкология,  
лучевая терапия)

  
Стилиди Иван Сократович


Заведующий кафедрой  
общей и медицинской генетики МБФ,  
доктор медицинских наук  
(специальность 1.5.7 генетика)



Воинова Виктория Юрьевна

Ученый секретарь  
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова  
Минздрава России  
к.м.н., доцент



  
Демина Ольга Михайловна

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России)

117997, г. Москва, ул. Островитянова, дом 1

Тел.: +7 (495) 434-14-22 e-mail: [rsmu@rsmu.ru](mailto:rsmu@rsmu.ru) сайт: <https://rsmu.ru/>