

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, академика РАН

Кушлинского Николая Евгеньевича

на диссертационную работу

Суспицына Евгения Николаевича

«Молекулярная диагностика наследственных заболеваний, ассоциированных с повышенным риском возникновения опухолей»,

представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.1.6. Онкология, лучевая терапия и 1.5.7. Генетика.

Актуальность исследования

Известно, что подавляющее большинство новообразований у человека возникает спорадически, по мере накопления критического числа мутаций в определенном клоне соматических клеток. Однако не менее 5–10% опухолей развивается на фоне наличия у пациентов мутаций, передающихся из поколения в поколение в соответствии с законами Менделя; в подобных случаях речь, фактически, идет о моногенных наследственных заболеваниях с аутосомно-доминантным типом наследования. Наряду с изучением молекулярно-генетических характеристик опухоли, в современной онкологии все чаще проводится поиск герминальных мутаций, обуславливающих высокий риск развития новообразований.

Наследственные опухолевые синдромы, манифестирующие преимущественно у взрослых, достаточно хорошо известны. В то же время существует целый ряд редких заболеваний, проявляющихся в детском возрасте, для которых типична очень высокая предрасположенность к развитию опухолей. По-видимому, минимум 15–25% опухолей детского возраста возникает в структуре того или иного генетического синдрома. Диагностика такого рода состояний в онкологической практике более сложна, т.к. возникающие опухоли не всегда имеют специфические клинико-морфологические черты, а другим

проявлениям заболевания (микроаномалии развития, частые инфекционные эпизоды, кожные пигментации и т.д.) уделяется недостаточно внимания. Повышение эффективности выявления пациентов, относящихся к группе повышенного онкологического риска, может быть достигнуто за счет более широкого применения молекулярно-генетических методов – в частности, высокопроизводительного секвенирования нового поколения.

В то же время, ДНК-диагностика редких заболеваний не всегда требует использования дорогостоящих и трудоемких методик. Дело в том, что частота наследственных болезней подвержена значимым вариациям в различных регионах мира, что объясняется особенностями генофонда разных этнических групп. Описание генетического груза популяций, т.е., характерного набора патогенных вариантов, может иметь большую практическую ценность, упрощая диагностику болезней генетической природы за счет первоочередного исследования наиболее часто встречающихся аллелей. Следует заметить, что, если генетика населения стран Европы и Северной Америки хорошо изучена, особенности многих других народов мира, в том числе, населяющих территорию Российской Федерации, нуждаются в более тщательном исследовании и систематизации. В связи с этим, актуальность научной работы Е.Н. Суспицына не вызывает сомнений.

Научная новизна

Результаты работы расширяют спектр имеющихся данных о молекулярно-генетических повреждениях, причастных к развитию синдрома Линча (наследственного неполипозного рака толстой кишки). Продемонстрировано, что, в отличие от наследственного рака молочной железы и яичников, для российских пациентов с синдромом Линча эффект основателя выражен лишь в незначительной степени. Впервые описана частота крупных перестроек генов MLH1 и MSH2. Еще более редким опухолевым синдромом является синдром Пейтца-Егерса. Автором описан спектр молекулярно-генетических повреждений у российских пациентов с этим заболеванием. Показано, что в группе больных

отсутствуют повторяющиеся мутации, но, при этом встречаются крупные геномные перестройки (делеции STK11).

Наибольшей степенью новизны отличается раздел работы, посвященный поиску генетических детерминант наследственного рака молочной железы (РМЖ). В настоящее время известно множество генов, мутации в которых ассоциированы с риском РМЖ, однако, эти сведения позволяют установить причину заболевания менее чем у половины больных с явными признаками наследственного рака. С помощью «кандидатного» подхода автором выявлен повторяющийся нонсенс-вариант в гене RecQL-хеликазы - *BLM*. Проведенные молекулярно-эпидемиологические исследования свидетельствуют, что данный аллель является славянской founder-мутацией, встречающейся в российской популяции с частотой не менее 0,2%. Гетерозиготное носительство упомянутого варианта многократно повышает риск развития РМЖ, тогда как гомозиготные индивидуумы страдают синдромом Блума - тяжелым наследственным заболеванием, манифестирующим в детском возрасте.

Очень ценным является описание особенностей морфологии и генетики опухолей молочной железы, развивающихся на фоне наличия наследственной мутации *BLM* (преобладание люминального экспрессионного профиля, отсутствие нестабильности микросателлитных повторов и потерь гетерозиготности).

Результаты работы вносят существенный вклад в сведения о генетике туберозного склероза. Несмотря на существование аналогичных исследований, сильной стороной работы Е.Н. Суспицына является тщательное описание клинических особенностей пациентов и анализ ассоциаций «генотип–фенотип». Продемонстрировано редкость семейных форм заболевания. Еще одной особенностью российских пациентов является достаточно частое выявление крупных перестроек гена *TSC2*. Описаны необычные характеристики пациентов, у которых не было выявлено мутаций *TSC1* и *TSC2*; в этой группе больных предпринята попытка поиска новых, ранее неизвестных генов туберозного склероза.

Впервые в России проведено крупное систематическое исследование, посвященное изучению генетики первичных иммунодефицитов (ПИД). Показано, что в ряде случаев инфекционные проявления развиваются у больных хромосомными заболеваниями и микроделеционными синдромами, формально не входящими в современную классификацию ПИД. Это подчеркивает роль врачей-генетиков в обследовании детей с рекуррентными инфекциями. При этом, важнейшим методом диагностики становится высокопроизводительное секвенирование (NGS). Автором продемонстрировано, что таргетное мультигенное секвенирование позволяет установить причину заболевания примерно у каждого пятого ребенка с признаками возможного ПИД.

Проведено исследование крупной по численности группы пациентов с атаксией-телеангиэктазией, заболеванием, при котором новообразования являются наиболее частой причиной гибели пациентов. Показано, что у российских больных большинство патогенных аллелей АТМ представлены тремя «славянскими» вариантами.

Значительной научной новинкой обладает описание фенотипа российских пациентов с синдромом Блума. Отсутствие у больных лицевой эритемы, которая считается одним из патогномоничных признаков заболевания, является возможным объяснением редкого установления этого диагноза.

Кроме того, в результате работы над диссертацией получен патент на изобретение, предлагающий новый экономичный способ таргетного обогащения отдельных участков ДНК с целью высокопроизводительного секвенирования (№ 2755538 от 17.09.2021 «Способ синтеза наборов олигонуклеотидов для ампликонного таргетного секвенирования»).

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационное исследование, выполненное соискателем, базируется на изучении очень крупных выборок пациентов. Проанализированы сведения о более чем 5000 пациентах с карциномами различных локализаций: толстая кишка (n = 2889), молочная железа (n = 1498), легкое (n = 339), яичники (n = 199). Также

к исследованию привлечены очень значительные, с учетом редкости данных патологических состояний, выборки пациентов с синдромом Пейтца-Егерса, туберозным склерозом, а также различными формами первичных иммунодефицитов. Создание и изучение коллекций образцов подобного размера является результатом многолетней работы и взаимодействия с рядом лечебно-профилактических учреждений. В качестве контрольной группы использовали образцы 2184 здоровых доноров.

Работа представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование. Научные положения диссертации соответствуют пунктам паспорта научных специальностей 3.1.6. – онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика.

Достоверность результатов проведенного исследования обеспечивается достаточным объемом исследуемых выборок. Использованные молекулярно-генетические методики, а также методы статистической обработки полученных данных, адекватны поставленным задачам.

Все основные этапы диссертационного исследования, включая создание регистра пациентов, обработку данных историй болезни и результатов высокопроизводительного секвенирования, а также обобщение полученных результатов, выполнены автором лично. Непосредственно автором сформулированы цель, задачи и рабочие гипотезы, научно обоснованы выводы и практические рекомендации. Следует отметить, что лично автором проведено непосредственное обследование детей с признаками наследственных синдромов. Будучи практикующим врачом-генетиком, Е.Н. Суспицын обладает многолетним опытом медико-генетического консультирования, а также преподавания клинической и лабораторной генетики студентам и ординаторам медицинских ВУЗов.

Самостоятельно выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме работы, лабораторные исследования, а также статистическая обработка полученных результатов. Молекулярно-генетический анализ (таргетное и экзомное секвенирование нового поколения) выполнен совместно с коллективом

научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

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

По теме исследования опубликовано достаточное число научных работ: 52 работы, 48 из которых относятся к изданиям, рекомендованным перечнем ВАК РФ. 22 статьи опубликованы в журналах, относящихся к квартилю Q1. Также опубликована глава в монографии, посвященной туберозному склерозу и 82 тезиса материалов международных и отечественных научных конференций.

Научная и практическая значимость работы

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 РМЖ – транквирующий «славянский» вариант гена BLM.

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.

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.

Результаты исследования имеют большое прикладное значение. Обнаружены повторяющиеся «founder»-мутации, выявление которых позволит упростить и удешевить процесс ДНК-диагностики наследственного неполипозного рака толстой кишки, ряда случаев наследственного РМЖ, синдрома Блума и атаксии-телеангиэктазии. Разработаны критерии отбора пациентов с рекуррентными инфекциями для дальнейшего генетического исследования, разработана и апробирована таргетная мультигенная панель для диагностики первичных иммунодефицитов, что позволит улучшить диагностику заболеваний этой группы.

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Структура и содержание работы

Работа построена по классической схеме, 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.

Первая глава содержит обзор литературы, включающий несколько разделов, из которых первые два посвящены общей характеристике орфанных заболеваний и современным технологиям их диагностики. Здесь автор излагает сведения о спектре наследственных синдромов, в структуре которых встречаются новообразования, и систематизирует сведения о распространенности орфанных заболеваний в различных регионах России. Достаточно подробно описаны принципы высокопроизводительного секвенирования нового поколения,

изложены преимущества и ограничения NGS в диагностике наследственных болезней. Автор обоснованно высказывается в поддержку оценки распространенности наследственных заболеваний, основанной на изучении разнообразия и популяционной частоты патогенных аллелей. Иными словами, в процессе уточнения информации о спектре наследственных болезней использование массивов экзомных данных может служить альтернативой традиционному подходу, основанному на статистических сведениях, полученных лечебно-профилактическими учреждениями.

Разделы 1.3–1.6 посвящены конкретным нозологическим формам (наследственный неполипозный рак толстой кишки, синдром Пейтца-Егерса, наследственный РМЖ, туберозный склероз). Раздел 1.7 посвящен точкам соприкосновения между наследственными дефектами иммунной системы и онкологическими заболеваниями.

На протяжении всего текста автор подчеркивает значение молекулярно-генетических знаний для персонализированной медицины и рациональной организации медицинской помощи в регионах.

Глава «Материалы и методы» содержит сведения о дизайне исследования, характеристиках пациентов и критериях их отбора. Работа выполнена на крупных по численности группах больных (2289 пациентов с подозрением на синдром Линча, 1498 пациенток с РМЖ, 61 пациент с туберозным склерозом, 409 больных с клиническими признаками ПИД и т.д.). Автором использован широкий 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.). Использованные методы вполне адекватны поставленным задачам.

Глава 3 посвящена результатам собственных исследований и разделена на 4 отдельных блока.

Раздел 3.1. содержит результаты работы по исследованию пациентов с клиническими признаками синдрома Линча. Так, феномен микросателлитной

нестабильности был выявлен в опухолевой ткани 6% больных. Дальнейший поиск наследственных мутаций в генах mismatch-репарации показал сходную эффективность секвенирования по Сэнгеру и таргетного секвенирования нового поколения. В то же время, результаты свидетельствуют о целесообразности поиска крупных геномных перестроек *MLH1* и *MSH2* в процессе диагностики синдрома Линча. Отмечена более высокая частота выявления наследственных мутаций у пациентов с MSI-позитивными опухолями толстой кишки по сравнению с больными с MSI-позитивными карциномами эндометрия.

Раздел 3.2. посвящен молекулярно-генетическим аспектам редкой разновидности полипоза ЖКТ - синдрома Пейтца-Егерса.

В разделе 3.3. описано успешное применение «кандидатного» подхода к поиску новых генов наследственных заболеваний, результатом которого стало выявление патогенного варианта гена *BLM*. Расширенное исследование показало высокую популяционную частоту этого аллеля и его связь с риском развития рака молочной железы. Вместе с тем, ассоциация упомянутого аллеля с риском рака легкого и рака яичника не показана.

Приводится описание морфологических и генетических характеристик опухолей молочной железы у носительниц мутации гена *BLM*.

Следующий раздел посвящен исследованию пациентов с туберозным склерозом. Приведено описание спектра мутаций в известных генах, связанных с этим заболеванием (*TSC1*, *TSC2*). Проведен анализ ассоциаций между генотипом и фенотипом. У российских пациентов наблюдается доминирование спорадических форм; процент семейных случаев существенно ниже по сравнению с данными других авторов (5% против 11–38%). Значительная доля мутаций представлена крупными перестройками (делециями / дупликациями *TSC2*).

Показано, что больные туберозным склерозом без выявленных мутаций генов *TSC1/TSC2* имели более легкое течение заболевания по сравнению с теми, у которых дефекты этих генов были обнаружены. В частности, для первых характерны более поздний возраст на этапе установления диагноза, отсутствие кортикальных туберов и субэпендимальных узлов.

Отдельный блок результатов посвящен исследованиям первичных иммунодефицитных состояний. Продемонстрировано, что часть иммунодефицитных состояний связаны с хромосомными заболеваниями и микроделеционными синдромами. Среди детей с рекуррентными инфекциями патогенные варианты, ответственные за развитие моногенных ПИД удалось выявить в 22% наблюдений. Показано, что эффективность таргетного секвенирования существенно варьирует в разных клинических группах, стало быть зависит от использованных критериев отбора больных.

Особый акцент сделан на изучение синдромов с хромосомной нестабильностью (атаксия-телеангиэктазия, синдром Блума).

В группе пациентов с подозрением на атаксию-телеангиэктазию (АТ) мутации гена АТМ были выявлены у 100% обследованных, что свидетельствует о надежности существующих клинико-лабораторных критериев этого заболевания; обнаружены повторяющиеся «мажорные» мутации, характерные для российских пациентов.

Описаны клинические и генетические особенности больных с синдромом Блума. В частности, результаты свидетельствуют о нетипичном фенотипе пациентов, гомозиготных по славянской founder-мутации. Проведена оценка популяционной частоты ряда патогенных вариантов, ассоциированных с развитием ПИД.

В заключении автор обобщает полученные данные. Выводы диссертации логически вытекают из результатов исследования и полностью соответствуют сформулированным целям и задачам. Даны практические рекомендации. Описаны перспективы дальнейшей разработки темы. Ссылки на использованные источники в тексте соответствуют списку литературы.

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

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные автором результаты имеют значимую научную и практическую ценность. Результаты и выводы диссертационной работы Е.Н. Суспицына могут быть использованы в деятельности медицинских учреждений онкологического профиля, а также специалистов первичного звена, участвующих в диагностике первичных иммунодефицитных состояний.

Результаты исследования и разработанные методики уже внедрены в практическую деятельность научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Материалы диссертации используются на кафедре общей и молекулярной медицинской генетики Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета в процессе обучения студентов и клинических ординаторов.

Замечания и вопросы


Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет. Обнаруженные замечания носят стилистический характер и не влияют на положительную оценку данной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы вносят существенный вклад в развитие трансляционной медицины. 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 завершенным научным трудом и полностью 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 ее автор заслуживает присуждения ему искомой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.1.6. Онкология, лучевая терапия и 1.5.7. Генетика.

Официальный оппонент: доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации


 _____ Кушлинский Николай Евгеньевич
 « 7 » ноября 2022 г.

Подпись официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора, академика РАН Кушлинского Н.Е. удостоверяю

Ученый секретарь

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

кандидат медицинских наук

Кубасова Ирина Юрьевна

Адрес: 115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Телефон: 8-499-324-15-20

E-mail: info@ronc.ru

