

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора медицинских наук, член-корреспондента РАН, профессора

Орлова Сергея Владимировича

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**

Несмотря на то, что большинство наследственных заболеваний относятся к редким (орфанным) состояниям, они представляют собой значительную медико-социальную проблему. Новообразования входят в спектр клинических проявлений многих наследственных заболеваний, нередко представляя наиболее значительную угрозу жизни и здоровью пациента. Онкологам хорошо известны такие опухолевые синдромы как наследственный рак молочной железы и яичников и наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча). В то же время, перечень редких заболеваний содержит немало нозологий, для которых, помимо других проявлений (врожденные пороки внутренних органов, множественные микроаномалии развития, иммунологические нарушения и т.д) характерен очень высокий риск развития солидных или гематологических новообразований; последняя группа представляет особый научный и практический интерес.

Диагностика наследственных заболеваний затрудняется рядом факторов, среди которых можно выделить недостаток информированности специалистов первичного звена, объяснимый крайней редкостью многих форм. В то же время, в совокупности наследственные заболевания затрагивают до 6-8% населения,

представляя значительную социальную и медицинскую проблему. Для болезней этой группы характерно многообразие клинических проявлений, в связи с чем на первый план выходят методы ДНК-анализа. В то же время, генетическая (локусная) гетерогенность некоторых заболеваний диктует необходимость применения дорогостоящих методов высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Своевременное выявление заболеваний, ассоциированных с наследственной предрасположенностью к опухолям, является основой для разработки программ профилактического наблюдения.

В отличие от многофакторных заболеваний, распространенность наследственных болезней имеет выраженные региональные особенности: спектр мутаций может очень сильно различаться в зависимости от географического региона и/ или этнического происхождения больных, что неизбежно влияет на алгоритм диагностики. Таким образом, описание особенностей генетического груза населения России в отношении заболеваний, ассоциированных с риском развития опухолей, обладает высокой актуальностью.

### **Научная новизна**

На большой группе больных охарактеризован спектр молекулярно-генетических повреждений в генах репарации неспаренных оснований ДНК, приводящих к развитию наследственного неполипозного рака толстой кишки (синдрома Линча). 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. Описан спектр молекулярно-генетических повреждений у российских пациентов с редкой разновидностью полипоза ЖКТ - синдромом Пейтца-Егерса.

Обнаружена новая «славянская» founder-мутация BLM, встречающаяся в российской популяции с существенной частотой и многократно повышающая риск развития рака молочной железы. Впервые описаны клинико-морфологические особенности карцином, возникающих у носительниц дефекта

BLM: в частности, продемонстрировано, что опухоли молочной железы развиваются по механизму гаплонедастаточности.

Охарактеризован спектр патогенных вариантов, приводящих к развитию наследственного синдрома с множественными гамартомами - туберозного склероза. У российских пациентов с туберозным склерозом показана необычная редкость семейных форм заболевания. Спектр молекулярных повреждений TSC1/TSC2 в целом соответствует данным, полученным другими исследовательскими коллективами, однако, автор указывает на высокую частоту нарушения числа копий гена TSC2. Описаны клинические особенности пациентов без выявленных мутаций TSC1 и TSC2.

Впервые в России проведено исследование, посвященное генетическим аспектам первичных иммунодефицитов (ПИД), результаты которого демонстрируют выраженную локусную гетерогенность. Очевидно, что оптимальным подходом к диагностике этих состояний является таргетное мультигенное секвенирование. При условии грамотного предварительного отбора пациентов данный метод позволяет выявить причину заболевания у 22% детей с подозрением на наличие ПИД.

Показано существование в России выраженного «эффекта основателя» в отношении атаксии-телеангиэктазии – синдрома хромосомной нестабильности, для которого характерен очень высокий риск развития гематологических и солидных новообразований.

Описаны нетипичные клинические особенности российских больных с синдромом Блума (отсутствие лицевой эритемы, вызванной инсоляцией).

Следует отметить и технологические инновации, разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования. Так, был предложен новый способ целевого обогащения последовательностей ДНК для дальнейшего высокопроизводительного секвенирования (патент на изобретение № 2755538 от 17.09.2021 «Способ синтеза наборов олигонуклеотидов для ампликонного таргетного секвенирования»).

## **Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов и практических рекомендаций**

Диссертация является завершенным научным исследованием. Научные положения диссертации соответствуют пунктам паспорта научных специальностей 3.1.6. - онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика. Достоверность результатов обеспечивается достаточным объемом исследуемых выборок (5500 пациентах и 2184 здоровых донора).

Методы статистической обработки адекватны поставленным задачам.

В ходе выполнения исследования использован целый спектр современных методов ДНК-анализа, включая таргетное и полноэкзомное секвенирование нового поколения; технические аспекты выполнения методик четко описаны.

Все основные этапы диссертационного исследования (анализ литературы, формулирование рабочих гипотез, работа с историями болезни, непосредственное обследование детей с признаками наследственных заболеваний, лабораторные процедуры и обработка полученных результатов) выполнены лично автором.

Выводы и практические рекомендации являются логичными и научно обоснованными.

С учетом особенностей проведенной работы (тесная связь онкологии и генетики) очень ценным представляется многолетний опыт работы автора в качестве врача-генетика, а также доцента кафедры общей и молекулярной медицинской генетики Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

Результаты диссертации ежегодно представлялись на научных мероприятиях в России и за ее пределами, что отражено в 82 тезисах материалов отечественных и зарубежных конференций.

По теме исследования опубликовано 52 научные работы, 48 из которых относятся к изданиям, рекомендованным перечнем ВАК РФ. 22 статьи выпущены в журналах, принадлежащих международному квартилю Q1; опубликована глава в монографии, посвященной туберозному склерозу.

### **Научная и практическая значимость работы**

В результате диссертационного исследования получены новые результаты, значимые для молекулярной онкологии и трансляционной медицины. Проведено исследование частоты и спектра мутаций, приводящих к развитию синдрома Линча и синдром Пейтца-Егерса. Несмотря на то, что эти темы ранее изучались в России, редкость этих состояний не позволяет за короткий срок создать значительные коллекции образцов, поэтому, данные, полученные автором, имеют большую практическую и теоретическую ценность. Установлена роль гена BLM в формировании высокого риска развития рака молочной железы; в этой связи особенно важным представляется факт высокой популяционной частоты одного из патогенных вариантов BLM в нашей стране.

Продемонстрировано, что анализ 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, реже встречается эпилепсия.

Разработаны критерии отбора пациентов с рекуррентными инфекциями для генетического исследования, позволяющие оптимизировать диагностику первичных иммунодефицитов (ПИД). 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). Описан особый клинический вариант этого заболевания у пациента, гомозиготного по «славянской» мутации BLM.

## Структура и содержание работы

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 предпосылках к проведению данного исследования.

Обзор литературы оптимален по объему и представляет большой интерес для онкологов. Два первых раздела 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.

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

Подглавы имеют сходную структуру, содержат актуальную информацию о генах, ассоциированных с заболеваниями, функции соответствующих белков и их участие в сигнальных каскадах, клинические признаки, спектр опухолевых проявлений, особенности морфологии неоплазм, подходы к ДНК-диагностике.

В главе «Материалы и методы» представлены общие характеристики пациентов, 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.). Описание использованных молекулярно-генетических методов (секвенирование по Сэнгеру, мультиплексная

лигазозависимая амплификация, таргетное и полноэкзомное секвенирование, аллель - специфическая ПЦР в режиме реального времени, иммуногистохимический анализ и т.д.) изложено с достаточной степенью детализации.

Результаты собственных исследований. Поэтапно описана последовательность работы по выявлению мутаций в генах репарации неспаренных оснований (MMR): отбор пациентов, анализ микросателлитной нестабильности в опухолевом материале, поиск мутаций в образцах крови. Проведено сравнение эффективности двух разных диагностических подходов (секвенирование по Сэнгеру + MLPA и таргетное NGS-секвенирование + MLPA). Показано, что чаще всего встречаются мутации MLH1 и MSH2; при этом, повторяющиеся варианты редко встречаются у российских пациентов с синдромом Линча.

Данные, полученные автором, свидетельствуют о надежности существующих диагностических критериев синдрома Пейтца-Егерса - мутации STK11 выявлены у 80% пациентов с клиническими признаками этого заболевания (сочетание кожно-слизистых пигментаций с гамартмными полипами ЖКТ).

Очень важным с точки зрения онколога является раздел, посвященный обнаружению новых генов, ассоциированных с наследственным раком молочной железы (РМЖ). Автором показано, что гетерозиготное носительство патогенного варианта VLM с.1642C>T (p.Q548\*) повышает риск развития РМЖ более чем в 6 раз; наблюдается погранично значимая ассоциация мутации с отягощенным семейным анамнезом. Ценность этого открытия еще более подчеркивается довольно высокой частотой этого аллеля в российской и других преимущественно славянских популяциях (0,2-0,6%).

Проведено исследование опухолей молочной железы, возникающих у носительниц мутации VLM: в частности, показано, что для этих новообразований нехарактерна потеря гетерозиготности в локусе VLM.

Продемонстрированная эффективность выявления мутаций у больных туберозным склерозом хорошо соответствует данным других авторов. Показано,

что мутации гена TSC2 встречаются значительно чаще, чем дефекты TSC1. 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 (11%) представлена крупными перестройками TSC2.

Показано, что больные ТС без выявленных мутаций TSC1/2 имели более лёгкое течение заболевания по сравнению с теми, у кого дефекты этих генов были обнаружены. В частности, для первых характерны более поздний возраст на момент диагноза, отсутствие кортикальных туберов и субэпендимальных узлов.

Крупный раздел результатов посвящен исследованиям первичных иммунодефицитных состояний (ПИД). Продемонстрировано, что часть иммунодефицитных состояний связаны с хромосомными заболеваниями и микроделеционными синдромами, а также относительно хорошо распознаваемыми фенотипами (синдром Ниймеген). Однако в большинстве случаев, учитывая высокую генетическую гетерогенность, выявление наследственного дефекта требует применения высокопроизводительного секвенирования. Эффективность таргетного секвенирования существенно варьирует в разных клинических группах: например, она является высокой в группе синдромальных ПИД и очень низкой – у пациентов с повышенным уровнем IgE или у детей с частыми рекуррентными респираторными инфекциями. Особый акцент сделан на изучение такой группы ПИД как синдромы с хромосомной нестабильностью (атаксия-телеангиэктазия, синдром Блума).

У пациентов с атаксией-телеангиэктазией обнаружены повторяющиеся «мажорные» мутации, характерные для российских пациентов.

Описаны клинические и генетические особенности больных с синдромом Блума. Проведена оценка популяционной частоты повторяющихся патогенных аллелей, ассоциированных с развитием ПИД.

Раздел «Заключение» содержит обобщение полученных данных. Выводы диссертации логически вытекают из результатов исследования и полностью соответствуют сформулированным целям и задачам. Практические рекомендации



четко изложены и легко реализуемы в условиях лечебно-профилактических учреждений. Список литературы отражает актуальное состояние обсуждаемых проблем, полностью соответствует ссылкам на использованные источники в тексте.

Автореферат отражает основные положения диссертации, хорошо иллюстрирован и оформлен в соответствии с регламентирующими документами. В целом, диссертация написана хорошим литературным языком. В тексте имеются опечатки, что не влияет на общую положительную оценку представленной работы.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Вышеизложенное позволяет констатировать, что 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 научно-квалификационным трудом, в котором, на основании проведенных исследований получены результаты, совокупность которых можно трактовать как достижение в области онкологии и медицинской генетики.

Работа 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 её автор заслуживает присуждения ему искомой степени доктора медицинских наук по специальностям: 3.1.6. - онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика.

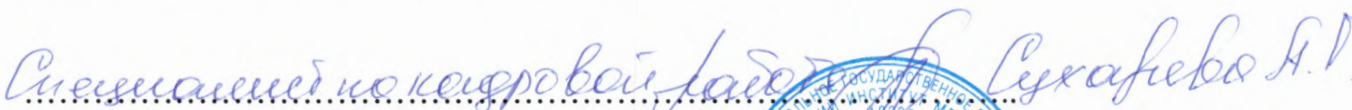
Официальный оппонент: доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, директор федерального государственного бюджетного

научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»

  
Орлов Сергей Владимирович

02 / ноября / 2022 г.

Подпись официального оппонента, доктора медицинских наук член-корреспондента РАН профессора Орлова С.В. удостоверяю

  
Сухачева А.В.

Федеральное государственное бюджетное **научное учреждение** «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (ФГБНУ «НИИ МП»).  
354376, Краснодарский край, г.Сочи, Адлерский р-н, с. Весёлое, ул. Мира, стр.177

Тел.: +7(862)243-20-28

Факс: +7 (862) 243-24-08

E-mail: mail@primatologia.ru

