

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Белогуровой Маргариты Борисовны на диссертацию Степанова Ильи Александровича на тему: «Разработка молекулярно-генетического подхода к диагностике синдрома Ли-Фраумени на основе высокопроизводительного секвенирования», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. – онкология, лучевая терапия

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Степанова Ильи Александровича посвящена изучению наследственного опухолевого заболевания, причиной которого является мутация в гене *TP53* – синдрому Ли-Фраумени (СЛФ). При этом синдроме вероятность развития злокачественной опухоли течение жизни близка к 100%. Возрастает число сообщений о случаях СЛФ, но реальная распространенность остается неизвестной. В работе внимание уделяется, прежде всего, способу диагностики при помощи метода высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS).

Обозначена основная техническая сложность проведения исследования при помощи NGS, связанная с наличием GC-богатых тугоплавких областей в гене *TP53*. В связи с такой особенностью строения гена, качество секвенирования резко снижается при использовании одной из распространенных методик подготовки NGS, обеспечивающих амплификацию целевого участка генома (*TP53*) – амплификация GC-богатых регионов происходит некачественно.

Для преодоления указанных трудностей автор предлагает использование реактивов для подготовки, приводящих к гибридизации целевого фрагмента и специфичных зондов (олигонуклеотидов) для гена *TP53*, после чего целевой фрагмент экстрагируется вместе с зондом (все участки извлекаются равномерно).

Набор таких зондов разработан и синтезирован собственноручно. Этот подход обеспечивает лучшее качество секвенирования и не уступает коммерческим аналогам, работающим по идентичному механизму, однако значительно дешевле.

Также в работе указана методика выбора кандидатов для тестирования, даны практические рекомендации. Проведено сравнение подходов к набору пациентов по системе международных критериев СЛФ и по менее строгой системе от автора работы. Выявлена низкая специфичность современных международных критериев. Впервые изучена распространенность СЛФ в России для пациентов с рядом опухолевых локализаций. Предложен способ сделать тестирование доступнее.

Научная новизна исследования и достоверность полученных данных

В результате исследования подтверждена эффективность разработанного набора зондов для гибридизации, проведена апробация. Выявлена частота наследственных

мутаций в гене *TP53* в опухолях российских пациентов. При помощи NGS протестирована самая большая из описанных в настоящее время выборок в стране – 1903 образца. Все пациенты разделены на три возрастные группы, согласно общепризнанному подходу.

Предложены и обоснованы возрастные границы для назначения NGS-тестирования (младше 50 лет вне зависимости от семейного анамнеза) для пациенток с раком молочной железы (РМЖ). Кроме того, в случае РМЖ предложено проходить NGS-тестирование одновременно трех генов – *BRCA1/2* и *TP53* для исключения другого опухолевого синдрома.

Достоверность полученных результатов доказана при помощи статистических методов (тест хи-квадрат (χ^2), для расчета ассоциации ПМЗО с СЛФ; $p=0,0001$) и использование программ для оценки качества секвенирования (HsMetrics).

Научно-практическая значимость

Решение задач, поставленных в исследовании, имеет как теоретическое, так и практическое значение. Врачебная тактика существенно изменяется при обнаружении у пациента СЛФ. Исследование доказывает, что у пациентов с ПМЗО (где одна из опухолей РМЖ), наследственные мутации в *TP53* обнаруживаются в 5,4% случаев – значительный показатель. Расширение доступности молекулярной диагностики обеспечивает рост числа позитивных случаев и как следствие – лучшее качество медицинской помощи.

Оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа построена классическим образом, включает в себя: введение, 4 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение полученных результатов и заключение), выводы, практические рекомендации, перспективы разработки темы, список сокращений, список литературы и приложения. Текст работы изложен на 121 странице, проиллюстрирован 15 рисунками, 17 таблицами. Список использованных литературных источников включает 135 позиций.

Во введении показана актуальность выбранной темы исследования, степень её разработанности, отражён личный вклад автора, сформулирована цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость выполненной диссертационной работы, представлены положения, выносимые на защиту.

В I главе автором выполнен обзор научной литературы, посвящённый изучению СЛФ. В обзоре приводятся, как исторические представления о природе различных опухолей при наследственных мутациях в *TP53*, так и обобщение актуальных научных знаний о молекулярном патогенезе, методах диагностики мутаций и врачебной тактике при обнаружении СЛФ.

Во II главе «Материалы и методы» представлен поэтапный план работы и дизайн исследования, охарактеризована изучаемая коллекция образцов. Подробно описаны

использованные молекулярно-генетические методы детекции наследственных мутаций в *TP53*, приведены примеры детекции позитивных и негативных образцов. Описаны статические методы, использованные при обработке полученных результатов в программе GraphPad Prism.

В главе III приведены непосредственно результаты диссертационного исследования.

Показан дизайн зондов и представлены результаты апробации, описаны основные технические характеристики NGS-тестирования при помощи разработанной авторской панели. Характеристики сравнивались с коммерческим аналогом от компании Roche с неизвестной последовательностью зондов.

Все образцы прошли NGS-тестирование, подготовка которого осуществлялось с использованием разработанной автором гибридизационной панели. Для тестирования исследуемой коллекции образцов РМЖ использовалась, разработанная соискателем, комбинация двух методик: ПЦР-тестирование для исключения мутаций в генах *BRCAl/2* (появившихся в популяции вследствие эффекта основателя) и NGS-тестирования одновременно трех генов – *BRCAl/2* и *TP53*. Такая методика полностью исключала вклад *BRCA*-ассоциированного опухолевого синдрома.

В позитивных образцах не обнаружены повторяющиеся варианты *TP53*. Определена встречаемость СЛФ у российских пациентов с РМЖ – 0,66%, с глиобластомой – 3,3%. Обнаруженные автором наследственные мутации оказались в большей степени характерны для пациенток с РМЖ старше 30 лет, но младше 50.

В главе IV «Обсуждение полученных результатов и заключение» приведено описание клинических данных пациентов со всеми выявленными вариантам *TP53*, представлены мутации в зависимости от эффекта, оказываемого на белок, оценена частота всех найденных мутаций согласно Международной Ассоциации Исследований Рака (МАИР/International Agency for Research on Cancer, IARC).

Работа заканчивается практическими рекомендациями, раскрывающими особенности выполнения молекулярно-генетической диагностики.

По теме диссертации соискателем опубликованы 4 работы, из них 3 из них в журналах, рекомендованных ВАК и 1 в зарубежном издании, входящем в системы Web of Science и Scopus.

Принципиальных замечаний по работе нет.

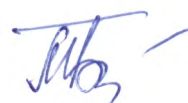
Заключение

Диссертационное исследование Степанова Ильи Александровича на тему «Разработка молекулярно-генетического подхода к диагностике синдрома Ли-Фраумени на основе высокопроизводительного секвенирования», представленное на соискание

учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. – онкология, лучевая терапия, является самостоятельной законченной квалификационной научно-исследовательской работой, имеющей существенное фундаментальное и научно-практическое значение. Выполненная диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (редакция от 11.09.2021 №1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям.

«16» мая 2024 г.

Заведующая отделением химиотерапии
(противоопухолевой лекарственной терапии)
и комбинированного лечения у детей
ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический
научно-практический центр
специализированных
видов медицинской помощи
(онкологический) имени Н.П. Напалкова»
доктор медицинских наук



Белогурова М.Б.

Подпись доктора медицинских наук Белогуровой М.Б. заверяю:

Начальник отдела кадров
ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический
научно-практический центр специализированных
видов медицинской помощи
(онкологический) имени Н.П. Напалкова»



Игнатова Е.А.

Контактная информация:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова» (ГБУЗ «СПб КНпЦСВМП(о) имени Н.П. Напалкова»)

Адрес: 197758, Санкт-Петербург, посёлок Песочный, Ленинградская ул., д. 68А, лит. А
Тел. +7 (812) 573-91-60, email: nponkcentr@zdrav.spb.ru