

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

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

Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Степанова И.А. посвящена способу повышения доступности диагностики синдрома Ли-Фраумени (СЛФ) при помощи молекулярно-генетических исследований. Оптимизация методики детекции наследственных мутаций в гене *TP53* – причины синдрома Ли-Фраумени – заключается в использовании разработанного автором набора компонентов (биотинилированных олигонуклеотидов) для подготовки секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS). Применение этого набора обеспечивает сопоставимое с готовыми коммерческими аналогами качество секвенирования, но значительно удешевляет NGS – пропадает необходимость постоянной покупки такого рода компонентов.

Актуальность выбранной темы исследования не вызывает сомнений и имеет научно-практическое значение для здравоохранения. Синдром Ли-Фраумени характеризуется чрезвычайно высоким риском возникновения опухолей. Зачастую синдром связан с развитием первично-множественных злокачественных образований.

Существующие международные стандарты диагностики СЛФ не регламентированы в России, распространенность не изучена. Не стандартизованы алгоритмы диагностики при сочетании нескольких методов исследования. Зачастую полагается, что NGS-исследование дорого, поэтому проводится редко. В работе установлена распространенность наследственных

мутаций в гене *TP53* в зависимости от возрастной группы и некоторых опухолевых локализаций. Кроме того, разработан и внедрен в практику диагностический алгоритм, сочетающий ПЦР-тесты и NGS для опухолей молочной железы.

Научная новизна исследования и достоверность полученных данных

Разработан дизайн зондов (биотинилированных олигонуклеотидов) необходимых для селекции таргетного участка – гена *TP53*. Набор зондов синтезирован автором самостоятельно.

По результатам тестирования коллекции образцов установлена встречаемость и спектр наследственных мутаций российских пациентов, определена клиническая характеристика позитивных случаев.

Достоверность полученных результатов обусловлена дизайном исследования, корректным выбором диагностических и статистических методов, а также достаточно большим объемом анализируемой выборки – 1903 образца, прошедших NGS-исследование.

Научно-практическая значимость

Автором разработан, апробирован и внедрен в практическую деятельность ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России подход к диагностике синдрома Ли-Фраумени. Предложен оптимальный алгоритм молекулярно-генетического тестирования пациентов с опухолью молочной железы, исключая долю *BRCA*-ассоциированных опухолей при помощи более дешевого и доступного способа – ПЦР-тестирования. Такой алгоритм позволяет не проводить NGS-тестирование в случае выявления мутации в генах *BRCA1/2*, возникших в популяции в связи с эффектом основателя. Кроме того, предлагается тестировать образцы от пациенток с опухолью молочной железы при помощи NGS одновременно на 3 гена: *BRCA1*, *BRCA2* (для исключения семейных случаев, не связанных с

эффектом основателя) и *TP53* (для исключения СЛФ). Даны практические рекомендации для специалистов, предоставлены протоколы производства зондов для NGS и праймеров для ПЦР. Все это в совокупности позволяет расширить набор кандидатов для диагностики СЛФ.

Оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа изложена на 121 странице, оформлена по традиционному плану, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов, результатов исследования, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Текст работы проиллюстрирован 15 рисунками, 17 таблицами и 3 отдельными приложениями с таблицами. Список литературы включает 135 источников.

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, определены цели и задачи исследования, научная и практическая значимость диссертационной работы.

В первой главе «Обзор литературы» выполнен анализ источников, посвященных изучению этиологии, эпидемиологии и молекулярной патологии синдрома Ли-Фраумени. Обзор литературы содержит подробный анализ истории изучения СЛФ, зависимость спектра возможных опухолей от возраста, различие патогенных мутаций в гене *TP53* по влиянию на функцию продукта – белка. Описаны системы оценки функциональности белка p53. В обзоре приводятся особенности диагностики и врачебной тактики, если обнаружена наследственная мутация в гене *TP53*. Кроме того, приведены международные критерии для назначения пациенту NGS-исследования, перечислены тенденции в оценке риска развития опухоли и пенетрантности заболевания.

Во второй главе «Материалы и методы» представлен дизайн и этапы исследования, приведена характеристика изучаемой коллекции образцов, подробно описаны молекулярно-генетические методы, использованные в работе и методика синтеза набора биотинилированных олигонуклеотидов.

Третья глава «Результаты» содержит результаты выполненных экспериментов. Данные оформлены в графическом и табличном виде.

Представлены последовательности биотинилированных зондов и результаты апробации протокола секвенирования в приложении HsMetrics. Также описаны результаты NGS-тестирования всех образцов. Алгоритм диагностики для опухолей молочной железы, совмещающий ПЦР-тестирование и NGS показан в виде блок-схемы (flowchart).

Все позитивные образцы объединены в одну таблицу. Среди всех, нет повторяющихся вариантов гена *TP53*. По результатам проведенного молекулярно-эпидемиологического тестирования, наследственные мутации в *TP53* не обнаружены в возрастных группах: от рождения до 15 лет и старше 50 лет, встречаемость СЛФ не может оцениваться.

Встречаемость СЛФ в возрастной группе от 16 до 50 лет составила 0,66% у пациенток с РМЖ. Встречаемость СЛФ среди пациентов с глиобластомой составила 3,3% в такой же возрастной группе.

В четвертой главе «Обсуждение полученных результатов заключение» автор анализирует обнаруженные варианты мутаций и их ассоциацию с клиническими характеристиками. Также приводится дополнительная статистика, согласно которой, для пациенток с первично-множественными злокачественными образованиями (одно из которых – РМЖ) составила 5,4%.

Выводы диссертации логичны, следуют из полученных экспериментальных данных исследования, соответствуют поставленным задачам.

Результаты работы изложены в 4 печатных работах, из которых 3 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, 1 – в зарубежном издании, индексируемом в базах данных Web of Science и Scopus.

Автореферат отражает основное содержание диссертационного исследования.

Замечания и вопросы.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Кутуковой С.И. нет. Имеющиеся недостатки в оформлении работы, орфографические ошибки и стилистические неточности не влияют на качество работы и выводы, вытекающие из нее.

По ходу изучения работы возникли дискуссионные вопросы, на которые хотелось бы получить от соискателя ответы:

1. Ваше исследование носит ретроспективный характер. Каким образом производилось формирование коллекции образцов (цельной крови) для проведения секвенирования?

2. Возможно ли использование разработанной Вами диагностической панели для изучения мутаций при злокачественных новообразованиях, не связанных с СЛФ?

Заключение

Диссертационная работа Степанова Ильи Александровича на тему «Разработка молекулярно-генетического подхода к диагностике синдрома Ли-Фраумени на основе высокопроизводительного секвенирования», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук является самостоятельной законченной квалификационной научно-исследовательской работой, имеющей существенное фундаментальное и научно-практическое значение, в которой решена важная задача – разработка и создание диагностической панели для высокопроизводительного секвенирования и изучения наследственных мутаций при синдроме Ли-Фраумени.

По своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости работа соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в действующей

редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Степанов И.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.6. – онкология, лучевая терапия.

Дата «16» мая 2024 г.

Профессор кафедры стоматологии
хирургической и челюстно-лицевой
хирургии, доцент кафедры онкологии
факультета послевузовского образования
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-
Петербургский государственный
медицинский университет имени
академика И.П. Павлова»,
доктор медицинских наук



Кутукова С.И.

Личную подпись заверяю:

Ученый секретарь
Ученого совета ФГБОУ ВО
«Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. И.П. Павлова»



Беженарь В.Ф.

Контактная информация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8
Тел. 8 (812) 338-78-95, email: info@lspbgtmu.ru