

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НМИЦ
онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России



А.М. Беляев

«1» сентября 2023 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертация «Разработка молекулярно-генетического подхода к диагностике синдрома Ли-Фраумени на основе высокопроизводительного секвенирования» выполнена в научной лаборатории молекулярной онкологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В 2019 году соискатель Степанов Илья Александрович окончил федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Лечебное дело».

В период подготовки диссертации соискатель Степанов Илья Александрович проходил обучение в аспирантуре федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по направлению подготовки «клиническая медицина» – 31.06.01, направленность программы – онкология.

С 2019 года Степанов И.А. работает в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России в научной лаборатории молекулярной онкологии в должности лаборанта.

Справка №568 об успешной сдаче кандидатских экзаменов выдана 29 июля 2023 года федеральным государственным бюджетным учреждением

«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель – Имянитов Евгений Наумович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель научного отдела биологии опухолевого роста ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

По итогам обсуждения принято следующее заключение: диссертация Степанова Ильи Александровича «Разработка молекулярно-генетического подхода к диагностике синдрома Ли-Фраумени на основе высокопроизводительного секвенирования», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, является самостоятельно выполненной законченной научно-квалификационной работой. Выполнено исследование мутаций в гене *TP53* в различных локализациях, определена частота синдрома Ли-Фраумени при опухолях молочной железы и головного мозга, разработана панель олигонуклеотидов для высокопроизводительного секвенирования.

Актуальность исследования

Синдром Ли-Фраумени (СЛФ) или *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром (heritable *TP53*-related cancer syndrome, сокращенно – h*TP53*rc) характеризуется фатальной предрасположенностью к возникновению широкого спектра опухолей (рака молочной железы, опухолей головного мозга, аденокарцином, сарком мягких тканей, остеосарком, гемобластозов).

Причина развития новообразований – наследственный дефект в гене *TP53* (гетерозиготная мутация). Несмотря на существование клинических критериев СЛФ, разнообразие и вариабельность проявлений затрудняет диагностику.

Врачебная тактика при установлении диагноза требует применения широкого спектра скрининговых исследований, а также многолетнего наблюдения за пациентами. Ввиду большой вероятности возникновения опухолей различных, перечисленных выше, локализаций, эти профилактические меры предполагают затраты со стороны системы здравоохранения и требуют внимания врача.

Сведения о распространенности СЛФ в России отсутствуют, а исследования в этой области ограничиваются описанием отдельных клинических случаев. В начале 21 века считалось, что СЛФ – редкое заболевание. Распространенность оценивалась в диапазоне от 1/5000 до 1/20000. Предполагалось, что манифестация происходит, чаще всего, в молодом возрасте. Появляются новые публикации, в которых авторы предполагают, что СЛФ в реальности встречается с гораздо большей частотой (1/2000), а опухоли,

ассоциированные с наследственными мутациями в гене *TP53*, поражают индивидуумов разных возрастных групп.

Разработанные клинические рекомендации для СЛФ в России ограничиваются рассмотрением адренокортикальных опухолей в составе синдрома Ли-Фраумени, а данные о возрастных группах и других нозологиях не учитываются. Таким образом, каждый клинический случай представляет строго индивидуальную схему ведения пациента, а принятие важных, но не стандартизированных решений остается в компетенции врача.

Молекулярно-генетический анализ последовательности гена *TP53* связан с целым рядом технических сложностей (наличие GC-богатых областей, широкий спектр возможных мутаций). Перспективным путем преодоления подобных трудностей представляется использование метода секвенирования нового поколения с предварительным селективным обогащением ДНК-библиотеки посредством гибридизации с зондами, специфичными к последовательности гена *TP53*. Метод успешно применен в работе.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования заключается в создании диагностической гибридизационной панели зондов для гена *TP53*, используемой на этапе обогащения при пробоподготовке для высокопроизводительного секвенирования (Next Generation Sequencing, NGS) впервые в РФ. Последовательность зондов подобрана в программе Benchling, синтез осуществлен на базе научной лаборатории молекулярной онкологии «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Панель предназначена для работы на платформе Illumina.

Существуют коммерческие гибридизационные панели для исследования гена *TP53* методом высокопроизводительного секвенирования, последовательность зондов в них не указывается производителем. Их необходимо закупать и использовать один раз. Синтез набора зондов позволяет получить олигонуклеотиды в количестве, позволяющем проводить пробоподготовку (селекцию таргетного участка) сотни раз – удешевление NGS. По показателям приложения NMetrics синтезированная панель не уступает коммерческому аналогу от компании Roche.

Кроме того, впервые исследована выборка образцов от пациенток с РМЖ младше 50 лет, насчитывающая более полутора тысяч (1726) образцов – самое масштабное исследование СЛФ в РФ.

Научно-практическая значимость работы

Суммарно протестирована выборка из 1903 образцов методом секвенирования нового поколения, выявлены 12 случаев СЛФ. Массовое выявление позитивных образцов объясняется значительным объемом выборки, корректным подходом к подбору коллекции образцов и разработкой эффективного алгоритма диагностики. Применение разработанной панели зондов для секвенирования нового поколения успешно выявляет случаи СЛФ и удешевляет процесс диагностики, делая его доступнее по сравнению с коммерческими аналогами.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность подтверждается достаточным объемом выборки и высоким материально-техническим обеспечением научной лаборатории молекулярной онкологии.

Алгоритм для диагностики СЛФ исключал вклад другого распространенного наследственного опухолевого синдрома (*BRCA1/2*-ассоциированного) в выборке РМЖ. Применение алгоритма позволило создать «обогащенную выборку», по которой оценивалась распространенность. Так как расчет процента *TP53*-положительных случаев не включал *BRCA1/2*-позитивные случаи, оценка распространенности скорректирована по самому значимому параметру и соответствует реальной картине.

Метод NGS расшифровывает полную кодирующую последовательность гена *TP53*, сайтов сплайсинга и некоторых участков интронов и позволяет обнаружить все известные при СЛФ мутации в гене *TP53*. Таким образом, исключается возможность пропуска мутации в любом участке гена. Обнаруженные мутации проходили валидацию альтернативным методом – секвенированием по Сэнгеру.

Доля СЛФ в выборке РМЖ рассчитана в процентах. Тестирование СЛФ при ПМЗО, когда одна из опухолей – РМЖ, обосновано по результатам теста Фишера при сравнении с выборкой от пациенток с РМЖ, $p=0,0001$ (то есть достоверно выше вероятность обнаружения СЛФ при ПМЗО).

Апробация диссертации состоялась на собрании расширенного заседания научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России (выписка из протокола №20/2023 от 29.08.23, протокол заседания № 14 от 14.06.23), устный доклад представлен на VIII Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи – 2022» (27.06.2022-03.07.2022, Санкт-Петербург).

Внедрение результатов работы в практику

Работа выполнена в рамках основных направлений исследования лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Полученные результаты работы были внедрены в научно-практическую деятельность подразделения (акт внедрения результатов от 24.07.23 г.).

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации

Личное участие автора состоит в выполнении молекулярно-генетических исследований на всех этапах: выделение нуклеиновых кислот, выполнение ПЦР и секвенирования, анализ результатов. Автором выполнена обработка, обобщение и интерпретация полученных экспериментальных данных.

Соответствие содержания исследования заявленным специальностям

Основные результаты работы, научные положения и выводы, описанные в диссертационной работе, соответствуют специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (медицинские науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из которых 2 – в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК, 1 – в зарубежных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

В диссертации соискателя отсутствуют заимствования материалов или отдельных результатов без ссылок на автора или источник заимствования.

Список научных работ соискателя ученой степени, в которых опубликованы результаты диссертационной работы:

1. Степанов И.А., Васильева Е.В., Соколенко А.П., Имянитов Е.Н. Частота и спектр наследственных мутаций в гене *TP53* в обширном исследовании российских пациенток с раком молочной железы // Вопросы Онкологии. – 2022. – Т.68. – №5. – С.589-597.

2. Степанов И.А., Васильева Е.В., Соколенко А.П., Имянитов Е.Н. Особенности наследственного *TP53*-ассоциированного опухолевого синдрома // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68. – №2. – С.140-148.

3. Sokolenko A.P., Sokolova T.N., Ni V.I., Preobrazhenskaya E.V., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Romanko A.A., Bessonov A.A., Gorodnova T.V., Anisimova E.I., Savonevich E.L., Bizin I.V., Stepanov I.A., Krivorotko P.V.,

Berlev I.V., Belyaev A.M., Togo A.V., Imyanitov E.N. Frequency and spectrum of founder and non-founder *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a large series of Russian breast cancer and ovarian cancer patients // Breast Cancer Res. Treat. – 2020. – Т.184. – №1. – С.229-235.

4. Степанов И.А., Васильева Е.В., Соколенко А.П., Имянитов Е.Н. Частота и спектр наследственных мутаций в гене *TP53* у российских пациенток с раком молочной железы // Белые ночи 2022: тезисы. VIII Петербургский международный онкологический форум. – Санкт-Петербург: АННО «Вопросы онкологии», 2022. – Т. 68. – №3. – С. 364.

Представленные сведения об опубликованных научных работах достоверны, отражают в полном объеме результаты диссертационного исследования, соответствуют требованиям к публикациям основных научных результатов диссертации, соответствуют требованиям Положения ВАК о порядке присуждения ученых степеней.

Заключение

Диссертационная работа Степанова Ильи Александровича «Разработка молекулярно-генетического подхода к диагностике синдрома Ли-Фраумени на основе высокопроизводительного секвенирования» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Заключение принято на расширенном заседании научной лаборатории молекулярной онкологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Присутствовало на заседании 32 чел.

Результаты голосования: «за» – 32 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет.

Протокол № 20/2023 от «29» августа 2023 г.

Учёный секретарь ФГБУ
«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, д.м.н.

 А.О. Иванцов