

Отзыв
официального оппонента

Профессора, доктора медицинских наук, члена-корреспондента РАН Сергея Владимировича Орлова на диссертационную работу Януса Григория Аркадьевича на тему: “Методы молекулярно-генетической диагностики наследственного рака толстой кишки”, представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности: 14.01.12 – онкология, 03.02.07 – генетика

Актуальность темы

На наследственный рак толстой кишки приходится около 5% всех случаев заболевания раком толстой кишки (РТК). Частота наследственных синдромов, связанных с формированием высочайшей степени риска развития РТК, доходит в некоторых популяциях до 1:500. Наследственный РТК представляет собой весьма гетерогенную группу, в которую входят около десяти различных заболеваний, разительно отличающихся как друг от друга, так и от спорадического РТК по своим клинико-биологическим характеристикам. Некоторые из этих нозологических единиц крайне редки и/или охарактеризованы совсем недавно, другие, в особенности синдром Линча (СЛ), семейный аденоматозный полипоз (САП) и MUTYH-ассоциированный полипоз (МАП) толстой кишки, встречаются значительно чаще. Варианты наследственного РТК иногда требуют особого подхода к лечению. Так, в терапии больных РТК с микросателлитной нестабильностью, возникшими в контексте синдрома Линча, следует учитывать относительно благоприятный прогноз таких новообразований по сравнению со спорадическим РТК, а также низкую чувствительность подобных опухолей к фторпиримидинам. Крайне важно выявление клинически здоровых, бессимптомных до определенного времени, носителей патогенных мутаций среди родственников больных наследственным РТК. Адекватное проведение

скрининговых и иных профилактических мероприятий в этой группе пациентов способно значительно снизить риск развития РТК, смертность от РТК и иных ассоциированных опухолей. Наконец, прогресс молекулярной генетики рака был и остается неразрывно связан с изучением наследственных опухолевых синдромов, в частности, наследственного РТК. Раскрытие особенностей канцерогенеза при наследственных формах РТК позволяет по-новому рассмотреть некоторые аспекты биологии, а, в конечном счете, и предложить новые подходы к лечению различных вариантов спорадического РТК. Все это делает изучение наследственного РТК весьма актуальной проблемой.

Очевидно, ни проведение исследований, ни адекватное ведение случаев наследственного РТК, ни тем более выявление бессимптомных носителей патогенных мутаций невозможно без постановки диагноза, верифицированного посредством молекулярно-генетической диагностики. Хотя в ряде случаев уже клиническая картина ясно указывает на наличие определенной разновидности наследственного РТК, фенотип больных и характеристики родословных могут варьировать в широких пределах, затрудняя постановку предварительного диагноза. Хорошо известен и повсеместно применяется характерный молекулярный критерий СЛ, микросателлитная нестабильность генома опухолей, развившихся на фоне дефекта системы репарации неспаренных оснований ДНК. Несмотря на низкую специфичность, в сочетании с достаточно «мягкими» клиническими критериями (пересмотренные критерии Bethesda) он оказывается крайне полезен для отбора больных на молекулярно-генетическую диагностику СЛ. Существуют характерные особенности спектра соматических мутаций и при МАП, которые могут быть использованы для скрининговой диагностики этого состояния. Например, в РТК, развивающемся в контексте МАП, встречается лишь одна из широкого спектра потенциально возможных замен в гене KRAS, p.G12C, редкая в спорадических РТК. Появление молекулярного критерия отбора больных было бы очень актуально именно

при МАП, рецессивном заболевании с неярко клинической картиной. Вместе с тем, апробация присутствия мутации p.G12C в гене KRAS в опухолевой ткани как критерия для направления больного РТК на генотипирование MUTYH проводилась ранее лишь в нескольких работах. Разрешение проблемы формирования оптимального сочетания молекулярных и клинических критериев диагностики МАП требует получения возможно большего количества эпидемиологических данных о встречаемости МАП в различных группах пациентов, а также среди клинически здорового населения.

Еще один распространенный подход к оптимизации молекулярно-генетической диагностики наследственных заболеваний – выявление популяционно-специфичных частых повторяющихся мутаций в причинно-значимых генах, обязанных своим возникновением популяционно-генетическому «эффекту основателя». Известно, например, что в Финляндии до 75% случаев СЛ вызваны двумя повторяющимися ‘founder’-мутациями, практически не встречающимися за пределами финской популяции. При проведении молекулярно-генетической диагностики СЛ в этой стране первоначально осуществляют скрининг пробанда на наличие этих повторяющихся повреждений, а лишь затем приступают к трудоемкому, длительному и затратному процессу анализа кодирующей последовательности ДНК всех ассоциированных с СЛ генов. Данные о спектре и структуре причинно-значимых мутаций, ассоциированных с тремя наиболее распространенными разновидностями наследственного РТК в России, крайне скудны и основываются всего на нескольких сообщениях. Особенно плохо изучена молекулярная эпидемиология МАП, известно лишь, что среди российских больных встречаются носители «европейских» повторяющихся мутаций p.Y179C и p.G396D в гене MUTYH.

Данная диссертация направлена на разрешение важной для современной онкологии и генетики задачи совершенствования молекулярно-генетической диагностики трех наиболее значимых разновидностей наследственного РТК.

Основные задачи для достижения данной цели можно свести к двум подходам: поиску повторяющихся в нашем регионе причинно-значимых патогенных мутаций и использованию суррогатного маркера уникальной «мутационной подписи» для выявления группы больных РТК, вероятно страдающих МАП. Полученные автором результаты позволяют оптимизировать стратегию проведения молекулярно-генетической диагностики изученных разновидностей наследственных РТК. Это определяет актуальность избранной темы диссертационной работы.

Цель диссертации:

Целью настоящей работы является совершенствование молекулярно-генетической диагностики трех основных разновидностей наследственного РТК.

Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В работе Г.А. Януса впервые был установлен повторяющийся в российской популяции характер двух мутаций, ассоциированных с развитием синдромом Линча. Впервые продемонстрирован повторяющийся характер мутации p.R245H в гене MUTYH среди российских больных МАП. Наконец, впервые была проведена оценка частоты МАП в российской популяции. Диссертационное исследование, таким образом, отличается существенной научной новизной. Ряд полученных результатов, не отличаясь принципиально новым характером, подтверждает и дополняет данные, полученные другими исследователями ранее.

Достоверность результатов настоящего диссертационного исследования подтверждается большим объемом исследованных выборок пациентов и здоровых лиц. В частности, для проверки повторяющегося статуса мутаций в генах, ассоциированных с СЛ, были в общей сложности прогенотипированы 46 пациентов с клиническими признаками наследственного рака толстой

кишки и/или микросателлитной нестабильностью в опухолевой ткани. Исследование спектра и структуры мутаций в гене APC проводилось у 30 пациентов, страдающих полипозом толстой кишки. У APC-негативных пациентов определялось наличие мутаций в гене MUTYH. Изучение спектра и структуры мутаций в гене MUTYH проводилось, помимо этого, в различных группах больных и здоровых лиц: 91 больных РТК с соматической мутацией p.G12C в гене KRAS, 169 больных неселектированным РТК, 1120 здоровых доноров. Молекулярно-генетические исследования проводились современными методами, адекватными поставленным задачам: аллель-специфическая ПЦР, ПЦР с последующим высокоточным анализом кинетики плавления, секвенирование по методу Сэнгера и т.д. Сформулированные научные положения, выводы и рекомендации логично и закономерно следуют из полученных результатов, что определяет их высокую достоверность.

Практическая значимость исследования

На основании полученных результатов были сформулированы рекомендации, имеющие важное практическое значение. Так, для российской популяции целесообразно внедрение ступенчатого алгоритма молекулярно-генетического тестирования больных с подозрением на СЛ, САП и МАП. Он заключается во введении этапа предварительного скринингового тестирования пациентов на выявленные в диссертационной работе повторяющиеся мутации в соответствующих причинно-значимых генах. Условием адекватного применения этого алгоритма можно считать сбор сведений об этническом происхождении пробандов. Еще одно важное практическое следствие работы - целесообразность направления всех больных РТК со сравнительно редкой соматической мутацией p.G12C в гене KRAS на диагностику МАП, так как в этой группе пациентов доля наследственных случаев, связанных с МАП, составляет приблизительно 7%.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной

работы

Результаты и выводы диссертационной работы Януса Г.А. могут быть рекомендованы к внедрению и использованию в медицинских учреждениях Российской Федерации, на базе которых проводится молекулярно-генетическая диагностика наследственного рака толстой кишки.

Структура и содержание диссертации

Рецензируемая работа изложена на 239 страницах машинописного текста, с использованием 758 источников российских и зарубежных авторов. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

Во введении продемонстрирована высокая актуальность научной работы, поставлены цели и задачи исследования, показана существенная научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе проведен обзор научной литературы по теме диссертации. Изложен современный взгляд на соотношение средовых и наследственных факторов риска развития РТК, показано, что сведения о наличии факторов высокого риска, таких как воспалительные заболевания толстой кишки или наследственные опухолевые синдромы, должны влечь за собой значительное изменение скрининговых программ. Выделены основные характеристики канцерогенеза при спорадическом РТК. Обоснована важность и практическая, клиническая значимость обособления многообразных разновидностей наследственного РТК друг от друга и от спорадического РТК. Изложены сведения о современных системах клинических и молекулярных критериев диагностики разновидностей наследственного РТК. Продемонстрированы современные возможности на пути оптимизации молекулярно-генетической диагностики наследственного РТК, сведения о спектре и структуре наследственных мутаций в различных популяциях, перечислены и охарактеризованы немногочисленные

русские работы на данную тему.

Во второй главе подробно описаны материалы и методы, применявшиеся в исследовании. Охарактеризованы группы больных, которым проводилось гентипирование. Следует отметить, что работа выполнена на большом материале. Детально изложены методики молекулярно-генетического анализа: выделение нуклеиновых кислот, ПЦР, гель-электрофорез продуктов ПЦР в полиакриламидном геле для определения статуса микросателлитных маркеров у больных с подозрением на СЛ; аллель-специфическая ПЦР и аллель-дискриминирующий тест, основанный на применении зонда TaqMan, для поиска предполагаемых повторяющихся мутаций на расширенных выборках; ПЦР с последующим высокоточным анализом кинетики плавления продуктов амплификации и секвенирование продуктов амплификации по методу Сэнгера для полного анализа кодирующей последовательности изучаемых генов в малочисленных выборках пациентов высокой степени риска; MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) - методика, направленная на выявление внутригенных перестроек. Описаны методы статистической обработки результатов, использованные для описания связи клинических и генетических характеристик пациентов. Здесь, впрочем, следует отметить, что установление корреляций между генотипом и фенотипом больных не относилось к основным задачам данной работы.

В третьей главе представлены результаты диссертационного исследования. Получены новые данные, дополняющие сведения о спектре и структуре мутаций, ассоциированных с синдромом Линча у русских больных. На расширенной выборке из 42 больных РТК с феноменом микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани впервые установлен повторяющийся характер мутации p.R226L в гене MLH1. Дополнен спектр и уточнена структура патогенных мутаций, выявленных в гене APC среди русских больных полипозом толстой кишки. Около четверти выявленных молекулярных повреждений ранее не были известны. Практически важно,

что около трети случаев семейного аденоматозного полипоза оказались связанными с носительством двух патогенных мутаций, p.Q1062fs* и p.E1309Dfs*4 в гене APC. Получены молекулярно-эпидемиологические данные о встречаемости различных мутаций в гене MUTYH в группах больных и здоровых лиц. Выявлены три повторяющиеся мутации в этом гене, причем повторяющийся характер мутации p.R245H у российских больных был установлен впервые. Показано, что у больных РТК с соматическими мутациями p.G12C в гене KRAS частота биаллельных повреждений гена MUTYH достигает 7%.

В четвертой главе проведено обсуждение полученных результатов. Показано место и значение данной работы в ряду сходных исследований отечественных и зарубежных научных коллективов, показана научная новизна, практическая значимость полученных результатов.

Далее сформулированы выводы и практические рекомендации, закономерно вытекающие из полученных результатов.

Работа изложена логично, ясным языком, легко читается. Принципиальных замечаний нет. Можно отметить наличие единичных опечаток, незначительных стилистических неточностей. Формально можно указать на некоторую избыточность материала, изложенного в первой главе, по отношению к общему объему диссертации, хотя по существу содержание первой главы вполне соответствует теме работы. Все эти замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы. По существу представленного дизайна проведенного исследования, его результатов и сделанных на их базе выводов замечаний нет.

Автореферат и опубликованные по теме диссертации работы достаточно полно отражают её основное содержание. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 3 - в журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК, а также 5 – в зарубежных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science, Scopus, PubMed, Springer.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Диссертация Януса Григория Аркадьевича на тему «Методы молекулярно-генетической диагностики наследственного рака толстой кишки» содержит новые молекулярно-эпидемиологические сведения о трех наиболее частых разновидностях наследственного РТК, которые могут быть использованы для облегчения и упрощения выявления случаев наследственного РТК молекулярно-генетическими методами. Она является научно – квалификационной работой, направленной на решение задачи, лежащей на стыке клинической онкологии и генетики и имеющей существенное значение для обеих специальностей. Диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.01.12 – онкология, 03.02.07 – генетика.

Директор

Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
медицинской приматологии»,

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук,
профессор



Сергей Владимирович Орлов

Адрес ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»:

354376, Краснодарский край, г.Сочи, Адлерский р-н, с. Весёлое, ул. Мира, д.177

Тел./факс: +7 (862) 243-20-28

E-mail: mail@primatologia.ru