

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Цуканова Алексея Сергеевича

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

Риск заболеть злокачественным новообразованием в течение жизни достигает в развитых странах 30-40%. При этом, на долю моногенных опухолевых синдромов, почти фатально предрасполагающих больного к развитию неоплазм одной или нескольких локализаций, приходится до 5% случаев онкологических заболеваний. Совершенствование подходов к выявлению моногенных опухолевых синдромов, как со стороны клинических критериев для отбора пациентов на молекулярно-генетическую диагностику, так и со стороны методологии непосредственно ДНК-диагностики: использование сведений о спектре мутаций и наличии частых этноспецифичных повторяющихся мутаций для «ступенчатого» анализа, выбор оптимального метода генотипирования – важнейшая задача современной онкологии и медицинской генетики. В самом деле, зачастую у наследственно-обусловленных новообразований обнаруживаются биологические особенности, позволяющие скорректировать стандартную схему лечения, а генотипирование родственников пациента помогает обеспечить клинически здоровым носителям патогенных мутаций надлежащие профилактические меры. В круг синдромов, охарактеризованных в работе Е.Н. Суспицына, вошли такие частые заболевания как семейный рак молочной железы, наследственный неполипозный рак толстой кишки (синдром Линча), а также туберозный склероз -

пример относительно редкого мультисистемного заболевания с многочисленными опухолевыми проявлениями.

Помимо классических моногенных раковых синдромов, значительную и часто пренебрегаемую медико-социальную проблему представляют собой редкие наследственные болезни, для которых опухолевая предрасположенность является лишь одним из широкого спектра проявлений. Особенно часто недооценивается онкологический риск для пациентов, страдающих тяжелыми синдромальными состояниями с младенчества или раннего детства – наблюдающие их специалисты первичного звена, а иногда и профильные врачи, имеющие дело с неонкологической «стороной» комплексного фенотипа, не всегда в состоянии проявить должную настороженность. Более того, в случае гетерогенных категорий индивидуально редких болезней со схожими клиническими проявлениями, зачастую сама постановка диагноза представляет собой большую проблему. В работе Е.Н. Суспицына затронута проблема диагностики первичных иммунодефицитов (ПИД): число ассоциированных с ними генов превышает четыре сотни, клинический диагноз на уровне конкретной нозологической формы поставить зачастую очень нелегко, как правило, пациенты с детства страдают тяжелыми инфекционными проявлениями. Между тем, до четверти больных, страдающих ПИД, в той или иной мере демонстрируют онкологическую предрасположенность. Гетерогенность ПИД требует применения современных широкоформатных методов генетического анализа, в т.ч. мультигенных панелей для высокопроизводительного секвенирования.

Таким образом, затронутые в работе проблемы: описание особенностей генетического груза населения России в отношении заболеваний, ассоциированных с риском развития опухолей, обладает высокой актуальностью.

Научная новизна

Ряд результатов получен при изучении различных разновидностей наследственного рака толстой кишки. Проведена ДНК-диагностика крупной когорты больных наследственным неполипозным раком толстой кишки

(синдромом Линча), в том числе с применением MLPA. В совокупности с имеющимися данными, полученными как автором работы, так и иными коллективами ранее, проведенное исследование не выявило выраженного эффекта основателя у российских больных синдромом Линча. Впервые проведен анализ встречаемости внутригенных перестроек MLH1 и MSH2. Анализ молекулярно-генетических дефектов у российских пациентов с полипозным синдромом Пейтца-Егерса показал, что у больных часто встречаются крупные делеции всего или части гена STK11, сделан значимый вывод о необходимости включения метода MLPA в алгоритм ДНК-диагностики этого заболевания.

Изучение рака молочной железы (РМЖ) с признаками наследственного опухолевого синдрома привело автора работы к обнаружению нового генетического локуса, ассоциированного с существенным повышением риска РМЖ: это ассоциированный с синдромом Блума ген BLM, в котором локализуется новая «славянская» founder-мутация BLM, встречающаяся в российской популяции с существенной частотой. Впервые выявлена как высокая частота этой мутации в России, так и связь гетерозиготного носительства данного инактивирующего дефекта BLM с опухолевой предрасположенностью. Впервые описаны клиничко-морфологические особенности карцином, возникающих у носительниц дефекта BLM.

Охарактеризован спектр мутаций, приводящих к развитию туберозного склероза у российских больных. Установлено, что эпидемиология этого факоматоза в России обладает рядом особенностей: наблюдается более выраженное, чем в литературе, преобладание спорадических форм заболевания над семейными, а также отмечается относительно высокая частота крупных перестроек гена TSC2. Показано, что пациенты, у которых не было выявлено мутаций TSC1 и TSC2, представляют собой особую группу в отношении клинических признаков заболевания, характеризующуюся более благоприятным течением и своеобразным сочетанием симптомов.

Впервые проведено крупное систематическое исследование, посвященное поиску генетических факторов предрасположенности к рекуррентным инфекциям

у российских пациентов. Охарактеризован широкий спектр состояний и ассоциированных с ними мутаций, затрагивающих различные компоненты иммунной системы. Применение таргетного мультигенного секвенирования в диагностике ПИД позволило выявить причину заболевания у 22% детей с подозрением на наличие ПИД.

Проведено систематическое исследование молекулярной эпидемиологии атаксии-телеангиэктазии у российских пациентов; показано существование в России выраженного «эффекта основателя» в отношении нескольких генетических дефектов ATM, показана необходимость выявления перестроек данного гена.

У российских больных с синдромом Блума, вероятно, за счет особенностей выявленной автором частой нонсенс-мутации VLM, описана нетипичное отсутствие характерной лицевой эритемы, вызванной инсоляцией. По-видимому, это является одной из причин недостаточно эффективной диагностики этого заболевания в России.

В рамках диссертационной работы получен патент на изобретение № RU2755538C1 от 17.09.2021 «Способ синтеза наборов олигонуклеотидов для ампликонного таргетного секвенирования», предлагающий новый экономичный способ целевого обогащения последовательностей ДНК с целью их дальнейшего анализа посредством высокопроизводительного секвенирования.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация является завершенным многолетним научным исследованием, выполненным на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Научные положения диссертации соответствуют пунктам паспорта научных специальностей 3.1.6. - онкология, лучевая терапия и 1.5.7. – генетика. Проанализированы сведения о 5500 пациентах и 2184 здоровых донорах.

Достоверность результатов проведенного исследования обеспечивается достаточным объемом исследуемых выборок, использованием адекватных

подходов и современных молекулярно-генетических методов, а также статистических методов обработки полученных данных.

Все основные этапы диссертационного исследования, включая создание регистра пациентов, обработку данных историй болезни и результатов высокопроизводительного секвенирования, а также обобщение полученных результатов, выполнены автором лично. Непосредственно автором сформулированы цель, задачи и рабочие гипотезы, научно обоснованы выводы и практические рекомендации.

Самостоятельно выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме работы, лабораторные исследования, а также статистическая обработка полученных результатов. Молекулярно-генетический анализ (таргетное и экзомное секвенирование нового поколения) выполнен совместно с коллективом научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Е.Н. Суспицын имеет первичную специализацию по специальности «генетика», многолетний опыт медико-генетического консультирования больных с наследственными заболеваниями, а также преподавания предмета медицинской генетики студентам и ординаторам Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

Основные результаты диссертации регулярно представлялись на научных мероприятиях в России и за ее пределами.

По теме исследования опубликовано 52 научные работы, 48 из которых относятся к изданиям, рекомендованным перечнем ВАК РФ. 22 статьи выпущены в журналах, принадлежащих квартилю Q1, также опубликована глава в монографии, посвященной туберозному склерозу и 82 тезиса в материалах отечественных и зарубежных конференций.

Научная и практическая значимость работы

В ходе работы Е.Н. Суспицыным получен целый ряд новых результатов. Изучение наследственного неполипозного рака толстой кишки (синдром Линча) и

разновидности наследственного полипоза ЖКТ (синдром Пейтца-Егерса), туберозного склероза и различных разновидностей ПИД позволило сделать практически значимые выводы о необходимости выявления внутригенных перестроек адекватными методами такими как MLPA. Попутно, при изучении туберозного склероза сделано потенциально важное наблюдение: 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 (кортикальных туберов и субэпендимальных узлов), а также редкая частота эпилепсии – это может свидетельствовать о наличии каких-либо особенностей мозаичного туберозного склероза, о необычных проявлениях атипичных мутаций (в глубине интронов, в промоторной зоне), неизвестного третьего гена туберозного склероза. Большую научную и практическую значимость имеет выявление нового гена наследственного рака молочной железы – BLM, а также морфологических и клинических особенностей ассоциированных с ним опухолей. Разработка и апробация мультигенного высокопроизводительного секвенирования для генотипирования ПИД представляет практический интерес. Разработаны критерии отбора пациентов с рекуррентными инфекциями для генетического исследования, позволяющие повысить эффективность выявления патогенных мутаций в генах системы иммунитета.

Выявлено несколько founder-вариантов, с высокой частотой встречающихся в России, что важно для диагностики ассоциированных с ними заболеваний: наследственного рака молочной железы, синдрома Блума и атаксии-телеангиэктазии. Впервые в России получены сведения о молекулярно верифицированных случаях синдрома Блума. Описана нетипичная клиническая картина этого заболевания (отсутствие характерной лицевой эритемы) у пациента, гомозиготного по рекуррентной «славянской» мутации BLM, чем, по-видимому, объясняется несоответствие между ожидаемой расчетной частотой гомозигот и реальным числом диагностированных случаев.

Структура и содержание работы

Научно-исследовательская 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 поставленных задач.

Обзор литературы состоит из нескольких подразделов, посвященных общей характеристике орфанных заболеваний и современным технологиям их диагностики, а также конкретным моногенным синдромам, изученным в рамках работы, и связи ПИД с онкологическими заболеваниями. Рассмотрены такие вопросы, как высокая совокупная встречаемость индивидуально редких орфанных заболеваний, значимость прогрессивных методов молекулярно-генетической диагностики для выявления мутаций в случае генетически гетерогенных нозологических категорий наследственных болезней. Охарактеризованы гены, повреждения которых приводят к развитию соответствующих раковых синдромов, функции белков-продуктов и их участие в сигнальных каскадах, клинические признаки, характерный спектр опухолевых проявлений и клинко-морфологические особенности ассоциированных с ними новообразований, существующие подходы к ДНК-диагностике, а также степень изученности проблемы в нашей стране. Данный раздел отличается обилием привлеченных источников, изложением принципиальных предпосылок к выполнению работы, ее места в структуре существующих научных знаний по данному вопросу, перспектив развития данных направлений биомедицинской науки.

В главе «Материалы и методы» представлена общая характеристика клинического материала, охарактеризован методологический инструментарий, приведены схемы, иллюстрирующие избранные автором подходы к выполнению исследования. Работа выполнена на чрезвычайно крупных 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.), изложены критерии набора пациентов. Рационально применен широкий круг современных молекулярно-генетических технологий (секвенирование по Сэнгеру, мультиплексная лигазозависимая амплификация, таргетное и полноэкзомное секвенирование, аллель - специфическая ПЦР в режиме реального времени, иммуногистохимический анализ и т.д.). Использованные материалы и методы, а также общие подходы к дизайну исследования вполне адекватны поставленным задачам.

Глава 3 посвящена результатам исследований. Детально описаны результаты промежуточных этапов исследований. Так, изложены результаты работы по выявлению наследственных дефектов в системе репарации неспаренных оснований (MMR): отбора пациентов с клиническими признаками синдрома Линча, анализа опухолевой ткани на предмет наличия микросателлитной нестабильности, поиска наследственных мутаций в образцах крови. Сопоставлена эффективность секвенирования по Сэнгеру и таргетного NGS-секвенирования для детекции микромутаций в генах MMR. Отмечено, что вероятность выявления наследственных мутаций генов MMR у пациентов с MSI-позитивными опухолями толстой кишки значительно выше, чем у больных с MSI-позитивными карциномами эндометрия ($p = 0,023$). Повторяющиеся варианты генов MMR редко встречаются у российских пациентов с синдромом Линча; только два варианта, MLH1 с.677G>T и MSH2 с.1906G>C, обнаружены у двух и более индивидуумов. В то же время, в 10,5% случаев обнаруживались крупные перестройки MLH1 и MSH2, что свидетельствует об обязательности использования метода MLPA в процессе диагностики.

Наследственные мутации STK11 выявлены у 80% пациентов с клиническими признаками синдрома Пейтца-Егерса. В то же время, наличие повторяющихся патогенных вариантов в этом гене не наблюдается у российских пациентов. Здесь

роль MLPA еще выше, чем в случае синдрома Линча, так как доля крупных делеций STK11 составила четверть от всех выявленных повреждений.

Секвенирование кодирующей последовательности гена BLM в группе высокого генетического риска (пациентки с выраженными признаками наследственного рака молочной железы) позволило выявить повторяющийся патогенный аллель BLM с.1642C>T (p.Q548*) (founder-мутация, характерная для российской популяции). Частота этой мутации в группе пациентов с РМЖ существенно превышает популяционную, что демонстрирует ассоциацию с высоким риском развития рака молочной железы. Впервые описаны клинико-морфологические и генетические характеристики карцином молочной железы, возникающих на фоне наследственного дефекта BLM. Показано, что развиваются данные неоплазмы по механизму гаплонедостаточности.

При исследовании пациентов с туберозным склерозом генетическая причина заболевания была выявлена в 87% случаев, что хорошо соответствует данным других исследовательских групп. Показано, что мутации гена TSC2 встречаются значительно чаще, чем дефекты TSC1. Примечательно значительное число повторяющихся аллелей TSC2: с.138 + 1G>A, с.1832G>A (p.R611Q), а также две крупных делеции. Поскольку эти варианты возникли *de novo*, они представляют собой «горячие точки мутагенеза», а не циркулирующие в генофонде патогенные founder-аллели. Проведен анализ ассоциаций между выявленными мутациями и фенотипом туберозного склероза. Важен результат, что больные туберозным склерозом 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. Причина развития такой вариантной формы туберозного склероза неясна: новый ли это локус, атипичная мутация, или же результат мозаицизма. У российских пациентов наблюдается более значительное преобладание спорадических форм над семейными, чем в мировой литературе; процент семейных случаев существенно

ниже по сравнению с данными других авторов (5% против 11–38%). Значительная доля мутаций (11%) представлена крупными перестройками TSC2.

Крупный раздел результатов посвящен исследованиям ПИД. Продемонстрировано, что часть иммунодефицитных состояний связаны с хромосомными заболеваниями и микроделеционными синдромами. Среди детей с рекуррентными инфекциями патогенные варианты, ответственные за развитие моногенных ПИД удалось выявить в 22% случаев. Показано, что эффективность таргетного секвенирования критически зависит от использованных клинических критериев отбора больных. Особый акцент сделан на изучение такой группы ПИД как синдромы с хромосомной нестабильностью (атаксия-телеангиэктазия, синдром Блума) – при этой категории ПИД особенно высок онкологический риск. В группе пациентов с подозрением на атаксию-телеангиэктазию мутации гена ATM были выявлены у 100% обследованных, что свидетельствует о надежности существующих клинико-лабораторных критериев этого заболевания; обнаружены повторяющиеся founder-мутации, характерные для российских пациентов. Описаны клинические и молекулярно-генетические особенности больных с синдромом Блума. В частности, результаты свидетельствуют о нетипичном фенотипе пациентов, гомозиготных по славянской founder-мутации. Проведена оценка популяционной частоты ряда патогенных вариантов, ассоциированных с развитием ПИД.

В заключении автор обобщает полученные данные. Выводы диссертации логически вытекают из результатов исследования и полностью соответствуют сформулированным целям и задачам. Даны практические рекомендации. Ссылки на использованные источники в тексте соответствуют списку литературы.

Автореферат отражает основные положения диссертации, хорошо иллюстрирован и оформлен в соответствии с регламентирующими документами. Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению автореферата и диссертации нет. В тексте диссертации содержатся стилистические неточности и опечатки, что не влияет на общую положительную оценку представленной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы вносят существенный вклад в развитие современной онкологии и медицинской генетики. 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 научным трудом и 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

руководитель отдела лабораторной генетики

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский

центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор медицинских наук



Цуканов Алексей Сергеевич

Подпись д.м.н. Цуканова А.С. заверяю

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский

центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор медицинских наук

Титов Александр Юрьевич



Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Национальный медицинский исследовательский

центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Почтовый адрес: 123423, г. Москва, ул. Саляма Адила, д. 2

Телефон: 8 (499) 642-54-41 (доб. 1332)

E-mail: info@gnck.ru

29.11.2022