

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Байкова Вадима Валентиновича
на диссертацию Тюрина Владислава Ильича на тему: «Изучение предиктивных
молекулярно-генетических маркеров эффективности терапии рака легкого»,
представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по
специальностям: 3.1.6. – онкология, лучевая терапия, 1.5.4. – биохимия

Актуальность темы диссертации

В диссертационной работе Тюрина В.И. рассматриваются перестройки генов некоторых рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью (*ALK*, *ROS1*, *RET*), в раке лёгкого.

Рак легкого - одна из самых распространенных злокачественных опухолей и лидер по показателям смертности среди опухолевой патологии. В последнее время появились новые препараты, способные подавлять продукты мутированных генов *EGFR*, *BRAF* и некоторых других. Кризотиниб и подобные ему молекулы ингибируют химерные белки, возникающие при транслокациях *ALK* и *ROS1*. Таргетный препарат для продукта гена *RET* был зарегистрирован FDA только в 2020 году. Таким образом, возможности таргетной терапии рака легкого постоянно расширяются. В то же время частота и спектр мутаций *ALK*, *ROS1* и *RET* в российской популяции пациентов с раком лёгкого изучены недостаточно. Определение частоты генетических перестроек имеет решающее значение для планирования терапии, а осознание биологической роли рецепторных молекул предполагает, в частности, исследование взаимосвязи между вариантом перестройки и эффективностью подавления функции рецептора. Поэтому в первую очередь необходимо иметь детальное представление о спектре возможных мутаций при опухоли определенного типа. Таким образом, выбранная тема имеет большое научно-практическое значение для здравоохранения, и ее актуальность не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования и достоверность полученных данных

В ходе исследования разработан комбинированный диагностический ПЦР-подход, основанный на оценке степени дисбаланса экспрессии 5'- и 3'-концевых фрагментов перестраиваемого гена и определения подтипа перестроек с помощью вариант-специфической ПЦР. Результаты тестирования обеими методиками сопоставлялись, а образцы, в которых результаты исследования не совпадали, частично подвергались таргетному РНК-секвенированию нового поколения (NGS) с целью идентификации ранее не описанных вариантов перестроек.

Результатом работы явилось установление частоты и спектра перестроек генов *ALK*, *ROS1* и *RET* в опухолях лёгкого у российских пациентов и систематизация характеристик пациентов в позитивных случаях.

Достоверность полученных результатов обусловлена продуманным дизайном исследования, корректным выбором диагностических и статистических методов, а также достаточно большим объёмом анализируемой выборки – 1000 последовательных образцов рака лёгкого.

Научно-практическая значимость

Автор разработал дизайн диагностических ПЦР-тестов, который был апробирован и внедрён в практическую деятельность НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Предложен оптимизированный алгоритм молекулярно-генетического тестирования пациентов с опухолью лёгкого и сформулированы практические рекомендации для специалистов. Всё это в совокупности позволит расширить охват пациентов, имеющих показания к таргетной терапии.

Оценка структуры и содержания работы

Диссертационная работа изложена на 120 страницах, оформлена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов, собственных результатов исследования, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Текст проиллюстрирован 21 рисунком, 11 таблицами и 3 отдельными приложениями с таблицами. Список литературы включает 172 источника.

Во введении автором обоснована актуальность выбранной темы, описана степень разработанности темы, определены цели и задачи исследования, охарактеризована научная и практическая значимость диссертационной работы, сформулированы положения на защиту. Кроме того, приведены сведения об апробации, публикации и внедрении результатов исследования, личном вкладе автора, соответствии диссертации паспорту научных специальностей. Оппонент подтверждает соответствие рецензируемого труда паспорту научных специальностей «3.1.6 – онкология, лучевая терапия» по п. 2, 3, 6 и «1.5.4 – биохимия» по п. 1, 10, 11.

Автор справедливо отмечает, что наиболее распространённые в клинической практике методы выявления транслокаций (FISH и ИГХ) не позволяют получить информацию о структуре химерного транскрипта. В связи с этим не вызывает сомнений необходимость в разработке метода ПЦР, позволяющего не только эффективно диагностировать перестройки, но и идентифицировать их вариант. Таким образом, цель работы, сформулированная как «оптимизация молекулярно-генетического тестирования для отбора пациентов с раком лёгкого на терапию ингибиторами тирозинкиназ» является актуальной и обоснованной.

В главе «Обзор литературы» выполнен анализ источников, посвящённых этиологии, эпидемиологии и молекулярной патологии рака лёгких. Обзор содержит подробные

сведения об истории изучения опухолей лёгкого, распространения табакокурения и вызванного им повышения заболеваемости раком лёгких. Описаны различия в заболеваемости и выживаемости пациентов разного пола и в разных странах. В обзоре приводится упрощённая патоморфологическая классификация рака лёгкого, рассматриваются две основные группы – мелкоклеточный и немелкоклеточный рак лёгкого с указанием основных подтипов последнего – аденокарциномы, плоскоклеточной и крупноклеточной карциномы. Рассмотрены общие механизмы злокачественной трансформации, детально представлена характеристика молекулярно-генетических изменений в клетках опухолей лёгкого. В контексте описываемых генетических нарушений (мишеней) приводится информация о существующих, а также о ещё разрабатываемых таргетных препаратах. Самостоятельный раздел посвящен перестройкам генов рецепторных тирозинкиназ *ALK*, *ROS1*, *RET*, а также методам их выявления – флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), иммуногистохимическому исследованию (ИГХ), мультиплексному цифровому анализу (NanoString nCounter), обратнo-транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и РНК-секвенированию нового поколения (NGS).

В главе «Материалы и методы» представлены дизайн и этапы исследования, приведена характеристика изучаемой коллекции образцов, подробно описаны молекулярно-генетические методы, использованные в работе. Критерии включения не вызывают возражений, подавляющее большинство образцов немелкоклеточного рака представляло собой материал аденокарциномы. Доля неудач при получении кДНК составила 11,2 %.

Глава «Результаты» содержит описание результатов выполненных экспериментов. Экспериментальные данные представлены в графическом (диаграммы) и табличном виде, что значительно улучшает их восприятие.

Продемонстрировано, что комбинированная ПЦР-методика выявления перестроек, разработанная автором, может быть успешно применена как для выявления уже известных вариантов транслокаций *ALK*, *ROS1*, *RET*, так и для идентификации новых химерных транскриптов при условии её использования в сочетании с NGS-секвенированием. С помощью такого подхода были выявлены 6 транслокаций, ранее не описанных в литературе: *EML4ex21/ALKex20*, *EML4ex13/ALKex3-ALKex20*; *UBCex1/ALKex18*; *CD74ex6/ROS1ex35*; *ACTBex6/ROS1ex35*; *EML4ex15/GOLGA3ex9*.

Автор обоснованно указывает на ограничения скринингового метода (оценки дисбаланса экспрессии 5'- и 3'-концевых фрагментов перестраиваемого гена) при тестировании *ROS1*-транслокаций. Это ограничение обусловлено высоким эндогенным

уровнем экспрессии гена *ROS1* в лёгочной ткани, что в большинстве случаев маскирует *ROS1*-позитивные наблюдения.

Частота исследуемых перестроек у российских больных составила: *ALK* – 6,1%, *ROS1* – 2,5%, *RET* – 1,1%. Общая характеристика *ALK*- и *ROS1*-позитивных случаев оказалась весьма типичной для подобных наблюдений – среди пациентов преобладали молодые некурящие женщины. Однако для транслокации *RET* была выявлена только одна значимая ассоциация с женским полом.

В четвёртой главе «Обсуждение полученных результатов и заключение» автор последовательно и систематично анализирует обнаруженные варианты транслокаций. Глава завершается представлением алгоритма молекулярно-генетического тестирования опухолей лёгкого, который может быть использован в практической деятельности врачами-онкологами, генетиками, патологоанатомами и другими специалистами. Заключение как такового в тексте, к сожалению, нет.

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

По теме диссертационной работы автором были опубликованы 10 статей, в том числе 2 статьи в отечественных журналах, рекомендованных ВАК и 8 – в зарубежных изданиях, индексируемых системами Web of Science и Scopus.

Автореферат отражает основное содержание диссертационного исследования.

Замечания. В тексте диссертации имеется ряд опечаток и стилистических неточностей («анапластическая крупноклеточная лимфома Ходжкина» - стр. 42, «точка разрыва транслокации» - стр. 43 и тп). Для обозначения генов автором использовался только прямой шрифт, в то время как обычно наименования генов пишут курсивом, а прямым шрифтом обозначают соответствующие им белки. Перечисленные недостатки не меняют общую положительную оценку работы.

При прочтении диссертации возникли следующие вопросы:

1. Почему все немелкоклеточные раки анализировались совместно, хотя известно, что мутационный спектр плоскоклеточного рака и аденокарциномы - разный? Какова доля плоскоклеточных и крупноклеточных раков в анализируемой коллекции образцов?
2. Как объяснить негативный результат NGS (мутации, в т.ч. транслокации не обнаружены) в 9 из 15 случаев с наличием несбалансированной экспрессии 3' и 5' концевых участков генов?

Заключение

Диссертационная работа Тюрина Владислав Ильича на тему «Изучение предиктивных молекулярно-генетических маркеров эффективности терапии рака

лёгкого», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук является самостоятельной законченной квалификационной научно-исследовательской работой, имеющей существенное фундаментальное и научно-практическое значение.

Диссертация соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями и дополнениями от 30.06.2014 №723, от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 20.03.2021 №426 и от 11.09.2021 №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Тюрин В.И. заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.6. – онкология, лучевая терапия, 1.5.4. – биохимия.

Дата «25» октября 2021 г.

Профессор кафедры патологической анатомии
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»,
доктор медицинских наук



В.В. Байков

Подпись руки заверяю: *Байков В.В.*
Специалист по кадрам
М.А. Пищелёва
"25" 10 2021 г.

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@1spbgmu.ru